



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA A PARTIR DE ÓLEO DE CARDO

Raquel Filipa Maia da Silva

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias

Co-orientador: Doutor Jorge Manuel Barros d'Almeida Gominho

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Isabel Maria Silva Sanches de Miranda, Técnica Superior do Superior do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Jorge Manuel Barros d'Almeida Gominho, Técnico Superior do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2011

AGRADECIMENTOS

Este trabalho enquadra-se no projecto “Produção de Biodiesel a partir de óleo de *Cynara cardunculus* (cardo), catalisada por uma lipase/aciltransferase (CYNARADIESEL)”, no âmbito do Programa Pessoa/Hubert Curien, acordo Portugal-França.

Um especial e sincero agradecimento à professora Suzana Ferreira Dias que, mesmo à distância e em recuperação, procurou sempre me orientar e apoiar neste projecto para que fosse levado a bom porto. Saliento o profissionalismo, conhecimentos transmitidos e amizade com que me envolveu.

À Mestre Dr^a Carla Tecelão por toda a ajuda oferecida, tempo disponibilizado e simpatia gratuita com que me acompanhou neste processo. Um obrigado muito grande por todos os conhecimentos transmitidos que foram sem dúvida benéficos. Agradeço, também, à aluna finalista de licenciatura Joana que me acompanho durante alguns meses nesta jornada final partilhando horas, conversas e conhecimentos.

O meu agradecimento à Rosário, à D. Graziela, à D. Maria Júlia e, em especial, à D. Marília do DAIAT pela colaboração, preocupação e carinho.

À técnica Isabel Baptista pela ajuda no manuseamento do equipamento de extracção do óleo das sementes de cardo para a produção de biodiesel.

À minha família, no geral, por todo o carinho e incentivo no meu percurso académico. Em especial agradeço aos meus pais, Gracinda e José, por todo o amor, ensinamento, confiança e motivação com que me envolveram permitindo que seguisse e conquistasse os meus sonhos.

Agradeço ao meu namorado Miguel Rodrigues por todo o amor, incentivo, compreensão, companheirismo e apoio que torna mais fáceis os dias mais difíceis. Obrigado meu amor por estares a meu lado.

Aos meus colegas de curso Marta, Sandro, Sara, Nani e Raquel que desde o primeiro dia até então, se tornaram o meu braço direito e me acompanharam, motivaram e acarinharam neste percurso universitário mas de vida também. Agradeço também à Nikas e Marisa por todo o apoio, amizade e disponibilidade demonstrada.

Às minhas amigas de sempre Lena, Joana, Inácio, Cátia e Li porque há amizades que do pouco nascem e para sempre ficam. Um especial obrigado a vocês porque o que hoje sou é em grande parte graças a vocês que estiveram sempre lá.

Por ultimo, agradeço a todos os meus amigos “maltex do grilex” que sempre me deram força, incentivo e coragem. Um obrigado por todos os momentos partilhados, bons e menos bons, mas que, de algum modo, foram todos eles essenciais.

RESUMO

Com este trabalho pretendeu-se determinar a produção de biodiesel a partir de óleo de sementes de cardo (*Cynara cardunculus*, L.) por catálise enzimática.

O óleo de cardo foi extraído de sementes de cardo de duas colheitas diferentes, 2007 e 2009, contendo 4,5% e 1,6% de ácidos gordos livres (AGL), respectivamente. O efeito do teor de AGL na cinética da reacção enzimática foi investigado.

O biodiesel (ésteres metílicos de ácidos gordos – EMAG) foi obtido por transesterificação do óleo bruto com metanol num sistema bifásico orgânico/aquoso na presença de um biocatalisador. A lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* foi usada na forma livre e imobiliza em resinas sintéticas (Accurel MP1000 e Eupergit C), em diferentes concentrações desde 0,13% a 2,65% na reacção.

Utilizando uma concentração de 0,28% de enzima na forma livre, obteve-se um rendimento máximo de 97% em EMAG ao fim de 24h de reacção. Na produção de esteres metílicos de ácidos gordos utilizando lipase/aciltransferase imobilizada obteve-se um menor rendimento, de aproximadamente dos 40%, contudo foi possível a recuperação e reutilização da enzima nos diversos estudos. Ficou provado que o teor de AGL no óleo de cardo não afecta a catálise enzimática.

Palavras-chave: biodiesel, esteres metílicos de ácidos gordos, imobilização, lipase/aciltransferase, óleo de cardo, transesterificação.

ABSTRACT

This work aimed the production of biodiesel from cardoon seed oil (*Cynara cardunculus* L.) by enzymatic catalysis.

The oil was extracted from cardoon seeds from two different crops, 2007 and 2009, and had a free fatty acid (FFA) content of 4.5% and 1.6%, respectively. The effect of FFA content in the enzymatic reaction kinetics was, therefore, investigated.

The biodiesel (fatty acid methyl esters - FAME) were obtained by transesterification of crude oil with methanol in a biphasic organic/aqueous system in the presence of a biocatalyst (enzyme). The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* was used in free form and immobilized in synthetic resins (Accurel MP1000 and Eupergit C) at different concentrations from 0.13% to 2.65% in the reaction.

Using an amount of 0.28% of enzyme in the free form, a maximum yield of 97% of FAME was obtained after 24h of reaction. In the production of fatty acid methyl esters using immobilized lipase/acyltransferase a lower yield of approximately 40% was obtained, but the recovery and reuse of the enzyme in different studies is possible. The FFA content in cardoon oils did not affect enzymatic catalysis.

Keywords: biodiesel, cardoon oil, fatty acids methyl esters, immobilization, lipase/acyltransferase, transesterification.

LONG ABSTRACT

The production and use of biodiesel have been increasing in recent years in order to reduce CO₂ emissions going in the direction of the Kyoto Protocol and the most recent European Directive 2009/28/EC. It was established a target of 10% increase of energy from renewable sources, especially biofuels, in the transport sector by 2020. Portugal proposed to overcome this share to 31% of energy from renewable sources in final consumption of raw energy.

In this study, the oil extracted from cardoon seeds was used as raw material for biodiesel production since it is considered an energy crop for biomass and oil production by the European Union (EC Regulation No.1701/2005, October 18th). The cardoon is a spontaneous crop in the Mediterranean regions, perenial, whit high regenerative capacity and adapted to poor soils and dry climates. Two oils, mechanically extracted from cardoon seeds, with an acidity of 4.5% and 1.6%, expressed as percentage of free fatty acids presented in the composition of crude oil, harvested in 2007 and 2009, respectively, were used. The effect of free fatty acid (FFA) content in the enzymatic reaction kinetics was, therefore, investigated.

The production of fatty acid methyl esters (FAME) was obtained by transesterification of cardoon oil with methanol, in a biphasic system organic/aqueous, catalyzed by the lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* in free form or immobilized in two diferents supports (Accurel MP1000 and Eupergit C). The reaction temperature was maintained at 40°C because it is the optimum operating temperature of this enzyme. The amount of enzyme used in the reaction ranged from 0.13% to 2.65% and the molar ration of oil/methanol/water was 0.2:2:5.

Using a concentration of 0.28% of the lipase/acyltransferase in free form, a maximum yield of 97% in FAME was obtained after 24h of reaction. In the production of FAME using immobilized enzyme, a yield close to 40% was observe after 48 hours.

With the immobilized enzyme in both supports, this yield is always lower probably due to inactivation of enzyme molecules during the immobilization and to diffusional limitations of substrates and products within the immobilization matrix. It was found that the support Accurel MP1000 adsorbs triacylglycerols in the microenvironment where the reaction will take place. The use of immobilized enzyme instead of the free enzyme, allows the recovery of the enzyme at the end of the

reaction and its reuse in different studies without losing its catalytic power. The FFA content in cardoon oils did not affect enzymatic catalysis.

Keywords: biodiesel, cardoon oil, fatty acids methyl esters, immobilization, lipase/acyltransferase, transesterification.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LONG ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE GERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE QUADROS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Enquadramento do tema	1
1.2. Objectivo	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O BIODIESEL.....	3
2.1.1. Motivações para a produção de biodiesel	3
2.1.2. Evolução e situação actual do biodiesel.....	4
2.1.3. Metas Europeias.....	6
2.1.4. Processo de produção de biodiesel.....	7
2.1.4.1. Fontes e tratamento de matérias-primas	7
2.1.4.2. Processo de transesterificação.....	10
a) <i>Transesterificação por catálise alcalina</i>	12
b) <i>Transesterificação de catálise ácida</i>	12
c) <i>Transesterificação por catálise enzimática</i>	13
2.1.4.3. Processo de purificação do biodiesel	14
2.2. O CARDO - <i>Cynara cardunculus</i> L.	17
2.2.1. Caracterização da planta	17
2.2.2. Produção de biodiesel a partir de sementes de cardo.....	18
2.3. AS ENZIMAS.....	20
2.3.1. Obtenção de enzimas.....	20
2.3.2. Caracterização das enzimas	20
2.3.3. Imobilização de enzimas	23
2.3.4. As Lipases	24

3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Materiais	27
3.1.1. Sementes e óleo	27
3.1.2. Lipase/aciltransferase	27
3.1.3. Reagentes	27
3.1.4. Equipamentos e utensílios	28
3.2. Métodos	28
3.2.1. Extração mecânica do óleo	28
3.2.1.1. Descrição do equipamento	29
3.2.1.2. Operação de extração	30
3.2.2. Determinação da acidez dos óleos	31
3.2.3. Imobilização da enzima	31
3.2.3.1. Preparação de solução tampão de fosfato pH 6,5 para imobilização da enzima	31
3.2.3.2. Imobilização da enzima em suporte Accurel MP1000	32
3.2.3.3. Imobilização da enzima em suporte Eupergit C	32
3.2.3.4. Preparação de solução tampão de fosfato pH 6,5 com 4M de metanol para conservação de enzima imobilizada	33
3.2.4. Produção de biodiesel	33
3.2.4.1. Preparação de solução tampão de fosfato pH 6,5, 50 mM para reactor (meio aquoso)	33
3.2.4.2. Modo de operação	34
3.2.4.3. Recolha de amostras	35
3.2.4.4. Recuperação da enzima imobilizada para reutilização	36
3.2.5. Análise dos produtos de reacção	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Determinação da acidez do óleo de cardo	40
4.2. Produção de biodiesel	40
4.2.1. Produção com enzima livre	41
4.2.2. Produção de biodiesel com enzima imobilizada	45

5.	CONCLUSÕES.....	50
6.	BIBLIOGRAFIA.....	51
7.	ANEXOS	55

INDICE DE FIGURAS

Fig.1 - Taxa de dependência energética portuguesa (%)	4
Fig.2 – Capacidade e produção de biodiesel na Europa.....	5
Fig.3 - Capacidade e produção de biodiesel nos diferentes países da união europeia	5
Fig.4 – Percentagem mínima de incorporação de biocombustíveis	6
Fig.5 - Objectivo para a quota de energia proveniente de fontes renováveis no consumo final bruto de energia, 2020.....	7
Fig.6 - Fluxograma das cadeias produtivas de biodiesel	8
Fig.7 – Transesterificação de triacilglicéridos com álcool: a) equação geral; b) três reacções consecutivas e reversíveis. R1, R2, R3 e R' representam os grupos alquila.....	11
Fig.8 – Flor de cardo	17
Fig.9 – Energias de activação necessárias para desenvolver uma reacção exergónica: (a) na ausência de catalisador; (b) na presença de catalisador químico; (c) na presença de enzima ..	21
Fig.10 - Influência da temperatura sobre a velocidade de uma reacção enzimática	21
Fig.11 – Variações da velocidade inicial de uma reacção enzimática em função do pH (exemplo da urease).....	21
Fig.12 – Prensa mecânica modelo “Täby Press type 20”	28
Fig.13 – Corpo central, funil e sistema de aquecimento da prensa.....	29
Fig.14 – Constituintes da prensa: parafuso sem-fim, “nozzle” e rosca de saída	30
Fig.15 – Prensa em funcionamento com saída de óleo e bagaço.	30
Fig.16 – Reactor de vidro de parede dupla em cima do agitador magnético	34
Fig.17 – Banho termostatizado	34
Fig.18 - Exemplo de uma placa de cromatografia em camada fina com as diferentes bandas dos constituintes da amostra: diacilgliceróis (DAG), ácidos gordos livres (AGL), triacilgliceróis (TAG) e ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG)	37
Fig.19 – Produção de biodiesel catalisada por enzima livre ao longo 6 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 0,13% (m/m)).....	41
Fig.20- Produção de biodiesel catalisada por enzima livre ao longo 6 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 0,28% (m/m)).....	42
Fig.21 – Produção de biodiesel catalisada por enzima livre ao longo 24 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 0,13% (m/m)).....	43
Fig.22 – Produção de biodiesel catalisada por enzima livre ao longo 24 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 0,28% (m/m)).....	43
Fig.23 - Produção de biodiesel catalisada por enzima livre ao longo 24 horas de reacção ([AGL]=1,6% e [lipase/aciltransferase] = 0,28% (m/m)).....	43

Fig.24 – Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Accurel MP1000 ao longo 48 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 2,65% (m/m))	45
Fig.25 – Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Accurel MP1000 ao longo 48 horas de reacção ([AGL]=1,6% e [lipase/aciltransferase] = 2,65% (m/m))	46
Fig.26 - Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Accurel MP1000 ao longo 48 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 0,54% (m/m))	47
Fig.27 - Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Accurel MP1000 ao longo 48 horas de reacção ([AGL]=1,6% e [lipase/aciltransferase] = 0,54% (m/m))	48
Fig.28 – Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Eupergit C ao longo 48 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 0,33% (m/m))	49
Fig.29 - Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Eupergit C ao longo 48 horas de reacção ([AGL]=1,6% e [lipase/aciltransferase] = 0,33% (m/m))	49

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Tratamentos aplicáveis aos óleos (adaptado de Tyson, 2003; Lima, 2004)	10
Quadro 2: Comparação entre processos de catálises ácida e básica para produção de biodiesel de óleos vegetais por transesterificação (Al-Zuhair, 2007).....	13
Quadro 3: Comparação entre a catálise alcalina e a catálise enzimática para produção de biodiesel (Macedo e Macedo, 2004).....	14
Quadro 4: Especificações do biodiesel para veículos de acordos com os Padrões Americanos (ASTM D-6751) ou os Padrões Europeus (EN 14214) (Robles-Medina <i>et al.</i> , 2009).....	15
Quadro 5: Propriedades do óleo de cardo (Fernández e Curt, 2004).....	18
Quadro 6: Propriedades dos ésteres etílicos e metílicos obtidos de óleo de sementes de cardo para a produção de biodiesel (EN-14214).....	19
Quadro 7: Comparação da actividade de transesterificação de diferentes lípases em diferentes substratos para produção de biodiesel (Bajaj <i>et al.</i> , 2010).....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AG - Ácidos gordos

AGL - Ácidos gordos livres (FFA: “free fatty acids”)

B100 – Biodiesel a 100%

Bio-ETBE – Bioéter etil-*ter*-butílico

BioMTBE – Bioéter etil-*ter*-metílico

BXX – Biodiesel a XX %, onde XX é a percentagem de biodiesel na mistura entre biodiesel e gasóleo fóssil.

CE – Comunidade Europeia

DAG - Diacilgliceróis

DME – Éter dimetílico

EC – Comissão das enzimas (enzyme commission)

EEAG – Ésteres etílicos de ácidos gordos (FAEE: “fatty acids ethyl esters”)

EMAG – Ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME: “fatty acids methyl esters”)

IUB - União Internacional de Bioquímica

MAG - Monoacilgliceróis

NP – Norma Portuguesa

TAG – Triacilgliceróis

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enquadramento do tema

A sociedade actual encontra-se consciencializada para os problemas levantados pelo abusivo consumo de combustíveis fósseis com significativo impacto no ambiente. Aliado a este facto, o crescente aumento dos preços do petróleo, a escassez de reservas e mudanças nas políticas bioenergéticas governamentais têm conduzido a uma aceleração na procura de biocombustíveis alternativos, de entre os quais se encontra o biodiesel.

Segundo a legislação europeia, entende-se por biodiesel, os ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) derivados de óleos ou gorduras, de qualidade de combustível para motor diesel.

O biodiesel é dotado de propriedades não tóxicas, renovável e biodegradável e pode ser produzido a partir de diversas oleaginosas como o Cardo (*Cynara cardunculus* L.). Esta é uma cultura não alimentar, espontânea nas regiões mediterrânicas, perene, de elevada capacidade regenerativa e adaptado a solos pobres e zonas secas. Estudos com o óleo de cardo têm sido desenvolvidos no âmbito do projecto europeu INTERREG III B “Espaço Atlântico”, “Energy Crops: Possibilities of Large Scale Implementation in the Atlantic Space”, coordenado pela Prof. Helena Pereira do ISA, visando a utilização da *Cynara* como planta bioenergética, produtora de biomassa para queima e de óleo para produção de biodiesel.

O óleo de cardo foi utilizado para produção de biodiesel, por transesterificação com metanol catalisada por metóxido de sódio, à escala laboratorial e piloto (30 L), numa instalação disponibilizada pela Fundação Maria Manuela e Vasco de Albuquerque d’Orey. Depois de purificado, este biodiesel apresentava os parâmetros de qualidade das normas europeias DIN EN 14214 (Sengo *et al.*, 2010). Estes resultados contribuíram para que a *Cynara cardunculus* fosse reconhecida pela UE como cultura energética para produção de biomassa e de óleo (EC Regulation nº1701/2005, October 18th).

Contudo, apesar da transesterificação catalisada por catalisadores inorgânicos ser um processo rápido e de baixo custo, devido à baixa selectividade destes catalisadores, o glicerol produzido apresenta baixa qualidade e as operações de separação e purificação dos ésteres metílicos são dispendiosas. Recentemente, tem-se investigado a possibilidade de substituir os catalisadores químicos por lipases

(triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3.) como catalisadores da transesterificação. As lipases são enzimas largamente comercializadas que em meio aquoso catalisam a hidrólise dos lípidos, a nível da interfase água/óleo. Em meio orgânico, catalisam reacções que não são possíveis em meio aquoso (e.g. esterificações, interesterificações e transesterificações).

Este trabalho enquadra-se no projecto “*Produção de Biodiesel a partir de óleo de Cynara cardunculus (cardo), catalisada por uma lipase/aciltransferase (CYNARADIESEL)*”, no âmbito do Programa Pessoa/Hubert Curien, Acordo Portugal-França. Pretende-se produzir biodiesel (ésteres metílicos de ácidos gordos) a partir de óleo de cardo, catalisado pela lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, na forma livre e imobilizada em diferentes suportes, em diferentes concentrações num sistema bifásico orgânico/aquoso com metanol.

1.2. Objectivo

Com este trabalho avaliou-se o potencial de produção de biodiesel (ésteres metílicos de ácidos gordos) a partir de óleo de cardo catalisada pela lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, na forma livre e imobilizada em resinas sintéticas (Accurel MP1000 e Eupergit C), num sistema bifásico orgânico/aquoso com metanol. Utilizou-se óleo cardo com diferentes valores de acidez, de modo a investigar o efeito dos ácidos gordos livres na cinética da transesterificação catalisada enzimaticamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O BIODIESEL

Os biocombustíveis incluem diversos produtos como o biodiesel, bioetanol, biogás, biometanol, biodimetiléter (DME), bio-ETBE, bioMTBE, biocombustíveis sintéticos, bio-hidrogénio, óleos vegetais puros e ainda gorduras animais e óleos vegetais reciclados (Directiva 2003/30/CE). O biodiesel e o bioetanol são destes os mais comuns na utilização em veículos de transporte rodoviário a gasóleo (biodiesel) e a gasolina (bioetanol) sendo que o primeiro que estará em destaque neste trabalho.

Desta forma, segundo a Directiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho Artigo 2º, o biodiesel é definido como (Jornal Oficial da União Europeia, 2003): “éster metílico produzido a partir de óleos vegetais ou animais, com qualidade de combustíveis para motor diesel, para utilização como biocombustíveis.”

O biodiesel pode ser utilizado puro ou misturado com diesel, em diferentes proporções, pelo que é utilizada uma nomenclatura particular de modo a identificar mundialmente a concentração de biodiesel em mistura. Desta forma, é utilizado o acrónimo BXX de forma distintiva, onde XX é a percentagem de biodiesel na mistura, como, por exemplo, B20 que representa uma mistura de 20% de biodiesel e 80% de diesel. As percentagens mais comuns verificadas para veículos ligeiros são na gama dos 5, 15, 20 e 30% de biodiesel em diesel (Carmona e Correia, 2009).

A maior parte dos veículos em circulação é capaz de utilizar misturas com baixo teor de biocombustível sem requerem modificações dos seus motores. Os avanços tecnológicos têm sido fulcrais levando a que, em determinados países da União Europeia, já se utilizem misturas com percentagens de 10% ou mais de biocombustíveis. O biodiesel pode ser utilizado até à forma pura (B100) mas qualquer mistura acima dos 20% requer modificações no sistema de distribuição dos combustíveis tradicionais.

2.1.1. Motivações para a produção de biodiesel

O biodiesel é tido, nos dias que correm, como uma excelente aposta na redução do impacto ambiental e como alternativa à utilização de combustíveis fósseis devido aos seus benefícios, uma vez que se trata de uma energia renovável, biodegradável e com propriedades não tóxicas. Aliado a este facto surgem benefícios

económicos para países, como Portugal, energeticamente dependentes de terceiros que vêem nos biocombustíveis uma solução ao crescente aumento dos preços do petróleo (Sarmiento, 2006). Na figura 1, podemos constatar a elevada dependência energética portuguesa (81,2% em 2009), em particular de combustíveis fósseis, embora se constate uma certa diminuição desde 2005, apesar de ter sofrido um ligeiro agravamento no ano de 2008, relativamente a 2007.

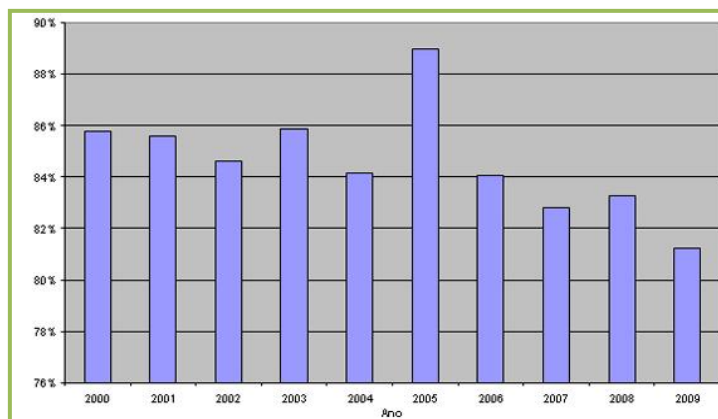


Fig.1 - Taxa de dependência energética portuguesa (%) (DGEG)

Aliada a esta crescente dependência, as reservas de combustíveis fósseis (energia não renovável) começam a chegar a limites críticos e as previsões de futuro, não sendo das mais animadoras, levam a um crescente aumento na procura de soluções. Estas soluções passam, em grande parte pelo desenvolvimento de novas técnicas e melhoramentos de produção de biodiesel. Porfírio (2006) apresenta mesmo uma estimativa de 45 anos de duração das reservas de petróleo, uma vez que as reservas existentes e as que se esperam descobrir não são suficiente para cobrir a utilização verificada actualmente.

2.1.2. Evolução e situação actual do biodiesel

Foi na década de 1970 que o mundo começou a tomar consciência de que algo tinha de ser feito para mudar a situação de dependência relativamente ao petróleo, iniciando-se a produção e utilização de biocombustíveis derivados de fontes renováveis, embora ainda hoje sejamos energeticamente suportados maioritariamente por combustíveis fósseis (Rosa, 2006). No caso mais específico da União Europeia, foi somente em 1992 que se começou a produzir e utilizar biodiesel verificando-se, contudo, um crescimento substancial nas últimas décadas (fig. 2).

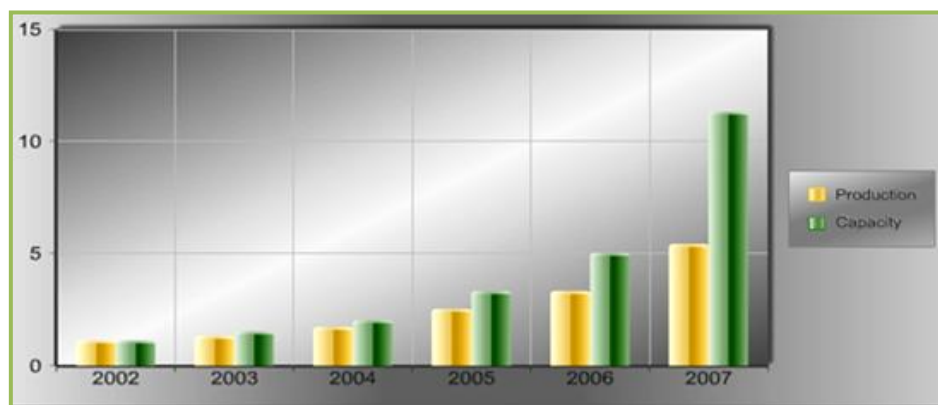


Fig.2 – Capacidade e produção de biodiesel na Europa (Biodiesel 2020, 2008)

Actualmente, a produção de biodiesel na União Europeia é responsabilidade de cerca de 120 fábricas que originam em média 6.100.000 toneladas de biodiesel anualmente (EBB, 2011). Estas empresas produtoras encontram-se localizadas, maioritariamente, na Alemanha, Itália, Áustria, França e Suécia (Fig.3). Pertence à Alemanha a maior percentagem de capacidade e produção de biodiesel que chega, mesmo, a ser superior a metade da produção verificada na totalidade da União Europeia.

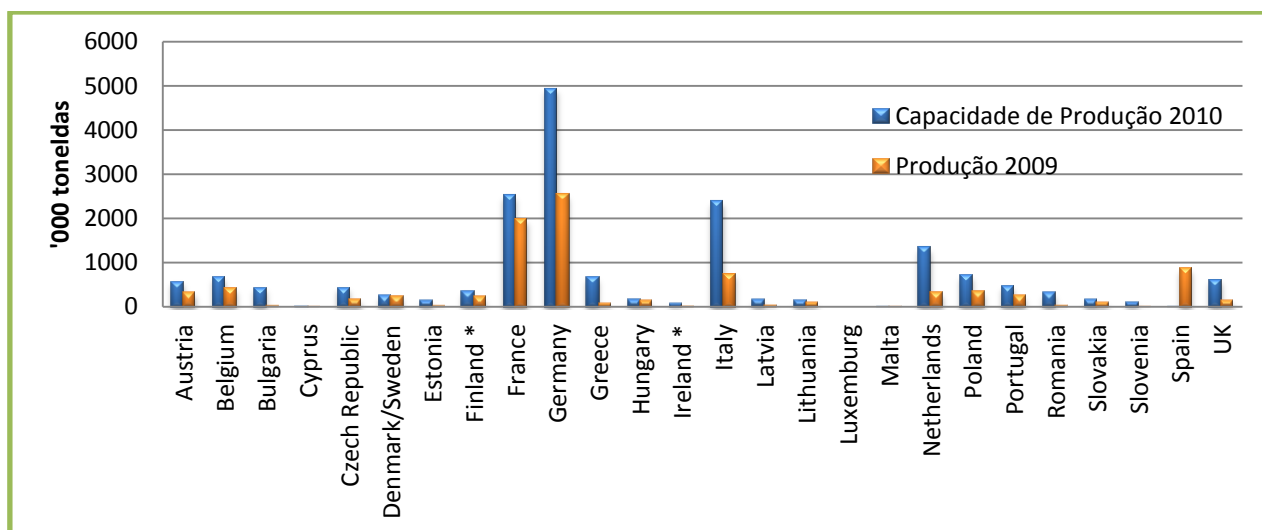


Fig.3 - Capacidade e produção de biodiesel nos diferentes países da união europeia (adaptado de EBB, 2011)

No caso particular de Portugal, no início, verificou-se um total desinteresse na produção de biocombustíveis, situação que só se alterou com a entrada em vigor da Directive 30/2003. Actualmente, a capacidade de produção de biodiesel em Portugal ronda as 500.000 toneladas distribuída entre cinco grandes produtoras, localizadas em Almada, Alhandra, Aveiro e Torres Novas (Carmona e Correia, 2009).

2.1.3. Metas Europeias

Os países em desenvolvimento ou desenvolvidos estão a aumentar o seu interesse pelos biocombustíveis como energia alternativa devido ao aumento do preço de combustíveis fósseis, segurança de reservas de energia e consciencialização ambiental. Os países mais desenvolvidos estão a mudar de legislações voluntárias para obrigatórias de forma a aumentar a quota de mercado de biodiesel dentro do sector dos transportes (Majer *et al.*, 2009).

O Protocolo de Quioto, assinado em 1992 mas apenas implementado em 2005, e a Directiva 2003/30/CE começaram por ser as duas medidas mais importantes para a redução de CO₂ e promoção da substituição de combustíveis de origem fóssil por alternativos. Portugal encontrava-se vinculado ao compromisso de redução de 5,2% das emissões de CO₂ de 1990 até 2010 e incorporação de 5,75% de biocombustíveis nos combustíveis rodoviários, num calendário específico (Fig.4).

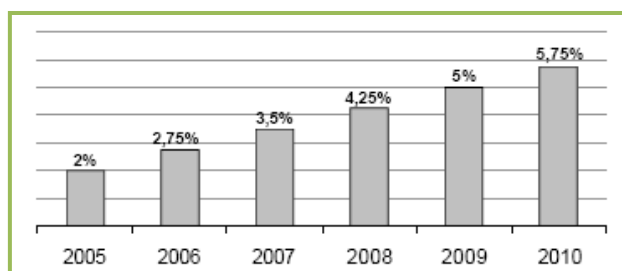


Fig.4 – Percentagem mínima de incorporação de biocombustíveis (Porfírio, 2006)

Dada a escassez de produção de matéria-prima, a nível nacional, para produção de biodiesel ou de bioetanol e o baixo rendimento das culturas, depreende-se que o cumprimento das metas apontadas de utilização de biocombustíveis em Portugal passam por 3 cenários (Rosa, 2006):

- 2.1.1. Importação directa de biodiesel e/ou bioetanol;
- 2.1.2. Produção de biocombustíveis a partir de matérias primas importadas;
- 2.1.3. Produção a partir de matérias primas nacionais.

Em 2009, a Directiva 2003/30/CE foi alterada e revogada pela Directiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis. Esta recente deliberação estabelece novos objectivos para todos os estados membros da União Europeia, na medida em que pretende que seja alcançada, até 2020, uma quota de 20% de energia

proveniente de fontes renováveis e de 10 % de energia proveniente de fontes renováveis, principalmente biocombustíveis, no sector dos transportes. A esta meta, Portugal sobrepõe outra individual de atingir 31% na quota de energia proveniente de fontes renováveis no consumo final bruto de energia em 2020. Esta ambiciosa meta nacional fica apenas atrás de outros quatro países: a Suécia, Letónia, Finlândia e Áustria, tal como se constata no figura 5 que apresenta os objectivos energéticos no diversos países da União Europeia.

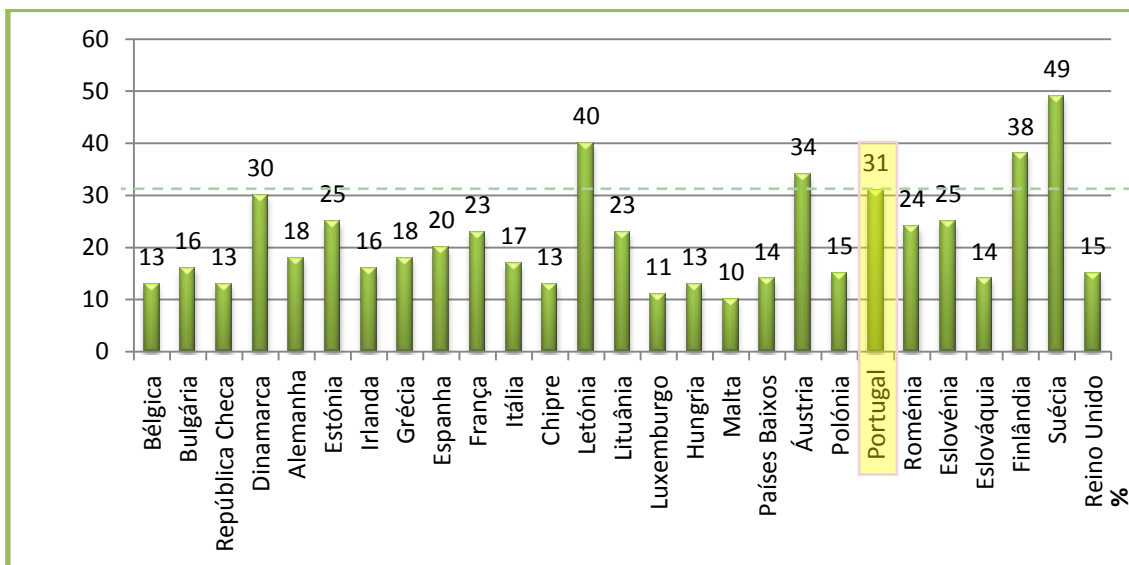


Fig.5 - Objectivo para a quota de energia proveniente de fontes renováveis no consumo final bruto de energia, 2020 (Adaptado de Directiva 2009/28/CE)

2.1.4. Processo de produção de biodiesel

O biodiesel é constituído por esteres de ácidos gordos de cadeia longa, provenientes de óleos ou gorduras, obtidos através de uma reacção de transesterificação no qual ocorre a transformação dos triglicéridos em biodiesel.

A produção de biodiesel é um processo que pode ser dividido em três etapas fundamentais, apesar de poderem diferir em muitos aspectos:

- Produção e pré-tratamento das matérias-primas;
- Reacção de transesterificação;
- Purificação do produto final.

2.1.4.1. Fontes e tratamento de matérias-primas

O biodiesel pode ser produzido a partir de qualquer óleo vegetal, gordura de origem animal ou, ainda, a partir de óleos e gorduras residuais. Como requisito

fundamental, para ser considerada a sua utilização como fonte de biodiesel, qualquer matéria-prima pertencente a estes conjuntos tem de possuir gorduras ou triacilgliceróis (Fig.6). Contudo, é importante salientar que, embora o biodiesel possa ser produzido a partir que qualquer fonte de gordura, nem todas estas fontes viabilizam actualmente o processo a nível industrial.

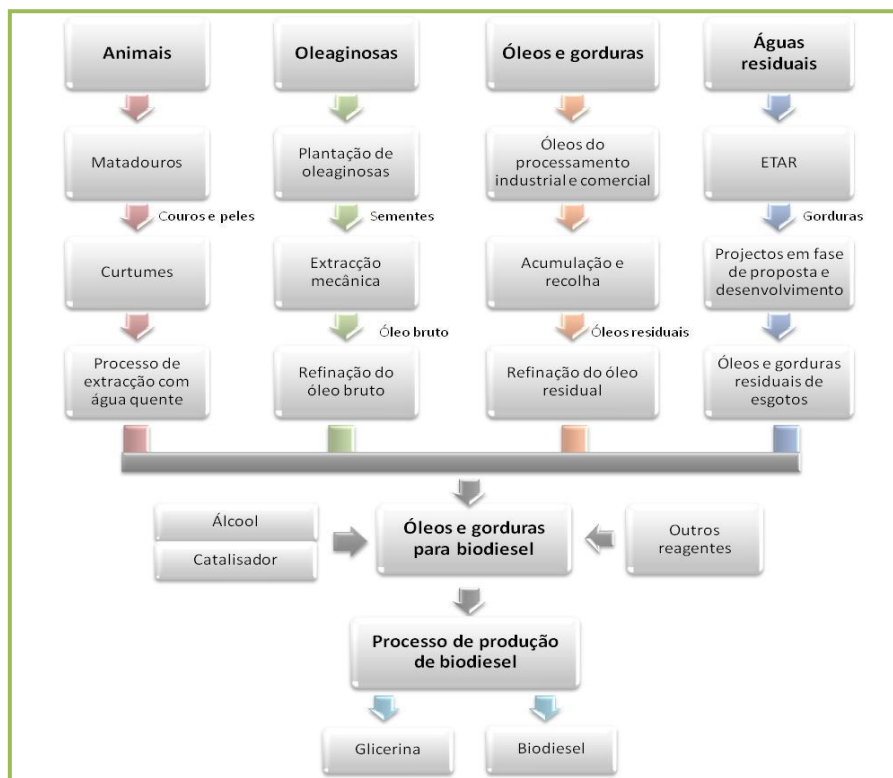


Fig.6 - Fluxograma das cadeias produtivas de biodiesel (adaptado de Filho *et al.*, 2003)

Os óleos vegetais, utilizados no processo de produção de biodiesel, devem ser extraídos de plantas oleaginosas por pressão, isto é, processos mecânicos e/ou métodos comparáveis, como a extracção com solvente, mas que não alterem composição e características do óleo extraído (Directiva 2003/30/CE). No processo mecânico de prensagem, além do óleo, é obtida uma bagaço, com 1/5 a 1/3 de óleo residual, que pode ser utilizada para alimentação animal ou para propósitos energéticos (p.e. matéria para unidades de biogás) (Majer *et al.*, 2009).

Mundialmente, os óleos vegetais mais utilizados pela indústria do biodiesel são os óleos de soja, colza, girassol e palma, estando a sua escolha directamente dependente da disponibilidade e clima característico da região em causa. A procura de matérias-primas, provenientes de plantações de oleaginosas, deve ser consciente e ponderada, tanto por parte de quem as procura como de quem as produz, na medida em que não deve contribuir para a destruição de terrenos ricos em biodiversidade,

devendo ser estabelecidos critérios de protecção da natureza e das espécies. A nível mundial, foram produzidos em 2007 cerca de 128 milhões de toneladas de óleos vegetais, sendo que mais de 80% destes óleos foram utilizados em alimentação e forragem, 10% para a indústria dos óleo-químicos, deixando para uso energético 7-8% do total de óleos vegetais produzidos (Majer *et al.*, 2009).

O biodiesel pode, também, ser obtido a partir de óleos e gorduras animais, onde se incluem o sebo, a banha de porco, a gordura de frango ou o óleo de peixe. Estes são fonte de ácidos gordos com estrutura química semelhante às dos óleos vegetais, o que possibilita a sua transformação em biodiesel, mas com diferença nos ácidos gordos predominantes (Lima, 2004). Por exemplo, o óleo vegetal de soja possui o ácido linoleico como ácido predominante enquanto o óleo de bagaço de azeitona possui o ácido oleico e o sebo de bovino possui o ácido oleico como ácido gordo predominante.

Os óleos e gorduras residuais, utilizados na produção de biodiesel, podem ter diversas fontes, sejam eles da indústria alimentar ou comercial, onde se incluem unidades de restauração e hotelaria, cantinas ou indústrias responsáveis pelo processamento de fritos, ou de águas residuais, de esgotos municipais e águas residuais associadas a indústrias alimentares (indústrias de curtume, de abatimento de animais, entre outros) (Filho *et al.*, 2003). Os óleos de fritura, uma vez que foram sujeitos a processos contaminantes, necessitam de passar por processos de refinação que os purifique antes de serem transesterificados.

Dados de 2008 indicam que 50% da capacidade de produção mundial de biodiesel encontra-se na Europa, onde se utiliza principalmente a colza; cerca de 30% da restante capacidade encontra-se distribuída entre América do Norte (20%), centro e Sul, com uma produção de biodiesel baseada na soja, enquanto que a Ásia possui os últimos 10% da produção, onde os frutos de palma são as principais fontes (Majer *et al.*, 2009).

Qualquer que seja a matéria-prima empregue na produção de biodiesel, esta deve-se encontrar em condições adequadas para a reacção de modo a ser alcançada a maior taxa de conversão possível, o que muitas vezes pode significar que esta seja previamente preparada, eliminando as impurezas e os compostos indesejáveis.

Por este motivo, a matéria-prima deve apresentar o mínimo de humidade e acidez possível, características alcançadas com processos de desumidificação ou secagem e neutralização com solução alcalina de hidróxido de sódio ou potássio,

respectivamente (Lima, 2004). Assim, dependendo do composto a eliminar/reduzir, os óleos vegetais e gorduras animais podem sofrer diversos tipos de tratamento, como o que são apresentados no quadro 1.

Quadro 1: Tratamentos aplicáveis aos óleos (adaptado de Tyson, 2003; Lima, 2004)

Tratamento	Modo operacional
Redução de ácidos gordos livres	Executada por neutralização ou por extracção por solvente. A neutralização consiste em adicionar uma base (NaOH, KOH), induzindo a formação de sabão, que deve ser removido antes de qualquer tratamento posterior. A extracção por solvente permite remover os ácidos gordos livres ou os triacilgliceróis utilizando um solvente como, por exemplo, o etanol ou o propano líquido (muito eficiente na redução da cor porque apenas remove triacilgliceróis)
Remoção de gomas e resíduos sólidos	Consiste na precipitação das gomas após adição de ácido fosfórico e injeção de vapor de água. Comum para óleos e gorduras em bruto que contêm, normalmente, grandes quantidades de fosfatídeos.
Filtração	Elimina pequenas proporções de sólidos existentes em suspensão e recupera líquidos contidos na fracção sólida de uma pasta. Pode realizar-se por gravidade (lento pelo que pouco utilizado na indústria) ou a vácuo (decorre a pressões negativas, de modo a acelerar o processo).
Secagem	Utilização de um agente secante, como o sulfato de magnésio anidro ou o sulfato de sódio anidro, para remover a água residual que possa existir no óleo.
Descoloração	Consiste na adição de carvão activado ao óleo, conseguindo-se a remoção de metais, água, insolúveis e pigmentos, reduzindo a cor e a possível turvação dos óleos e gorduras.
Desodorização	Reduz a quantidade de cetonas e aldeídos, aclara o produto através da destruição de carotenóides, reduz a quantidade de pesticidas, detergentes, metais, etc. Esta operação consiste numa destilação sob vácuo (2 a 5 mmHg) a 240 – 270° C, sendo por isso dispendiosa em termos energéticos.

2.1.4.2. Processo de transesterificação

O biodiesel é constituído, como já referido, por ésteres de ácidos gordos de cadeia longa (C₁₄-C₂₂), provenientes de óleos ou gorduras, e obtido através de uma reacção de transesterificação na qual ocorre a transformação dos triacilgliceróis em biodiesel. A transesterificação ocorre pela reacção dos óleos ou gorduras com um álcool simples (metanol ou etanol), mediada por um catalisador, originando ésteres metílicos ou etílicos e, como subproduto, o glicerol. O processo global é uma sequência de três reacções reversíveis e consecutivas, em que os monoacilgliceróis e os diacilgliceróis são os intermediários (fig.7).

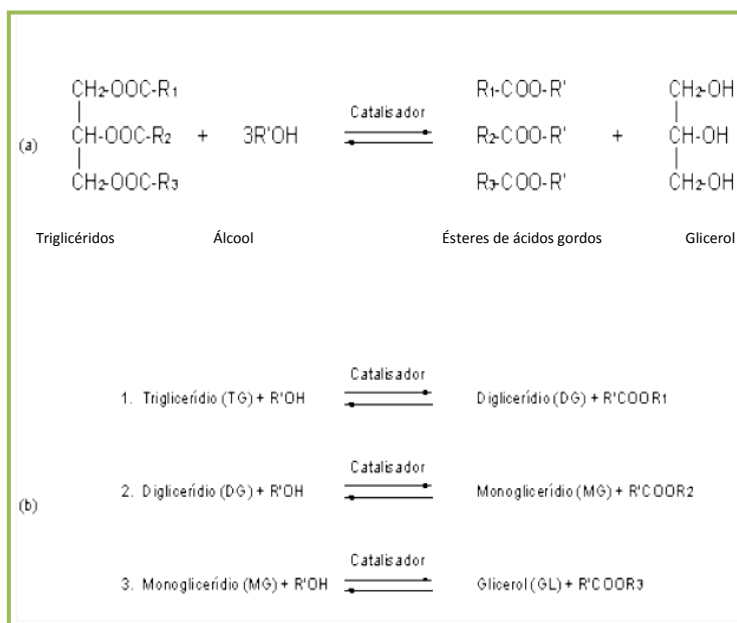


Fig.7 – Transesterificação de triacilglicéridos com álcool: a) equação geral; b) três reacções consecutivas e reversíveis. R1, R2, R3 e R' representam os grupos alquila. (Macedo *et al.*, 2004)

No processo de produção de biodiesel apenas podem ser utilizados álcoois simples tais como o metanol, etanol, propanol e butanol, sendo que os dois primeiros são os mais comuns. Contudo, o metanol é o mais utilizado, obtendo-se ésteres metílicos (EMAG), dadas as suas propriedades físico-químicas, a disponibilidade no mercado e o seu baixo custo (Macedo *et al.*, 2004); este álcool possui, comparativamente com o etanol, uma cadeia mais curta e maior polaridade, o que torna mais fácil a separação dos ésteres formados da glicerina (Lima, 2004). O etanol também é utilizado como agente de transesterificação, formando ésteres etílicos (EEAG), uma vez que é produzido a partir de fonte renovável, ao contrário do metanol, não levantando tantas preocupações relacionadas com a toxicidade; todavia, o etanol, requer ausência de água na sua composição e baixo conteúdo na matéria-prima, caso contrário a separação da glicerina será dificultada (Robles-Medina *et al.*, 2009).

O catalisador é introduzido no processo de transesterificação de forma a aumentar a velocidade de reacção, sem alterar a composição dos elementos envolvidos no processo. O mais comum é assistir-se à utilização de catalisadores de origem química, alcalinos ou ácidos, embora se comece a dar mais relevância a estudos e desenvolvimento de novos e melhores métodos de produção com catalisadores orgânicos, como é o caso deste estudo. Em seguida serão descritos e comparados estes três tipos de catalise na produção de biodiesel.

Além dos factores apresentados que influenciam a reacção, como o tipo de óleo usado ou catalisador, o processo de transesterificação é função da massa molecular do álcool, da relação estequiométrica estabelecida entre álcool e o óleo, temperatura da reacção, grau de pureza dos reagentes (principalmente o teor em água) e da acidez do óleo utilizado (Schuchardt *et al.* 1998; Verdugo *et al.*, 2010).

a) Transesterificação por catálise alcalina

O processo por catálise alcalina pode utilizar como bases o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, carbonatos e alcóxidos como o metóxido de sódio e o butóxido de sódio, num processo de transesterificação que requer menores temperaturas e permite obter maiores velocidades e grau de conversão que com catalisadores ácidos (Macedo e Macedo, 2004). Este é o método mais utilizado pela indústria, mas apresenta alguns problemas como a recuperação de glicerol, a necessidade de se inactivar e remover o catalisador, a necessidade de utilização de óleo sem ácidos gordos livres e o elevado consumo energético (Adamczak *et al.*, 2009). Sob condições alcalinas, os acilgliceróis e álcoois devem ser anidros pois a presença de água favorece a saponificação produzindo sabões a partir da reacção dos ácidos gordos livres com o catalisador (Al-Zuhair, 2007; Macedo e Macedo, 2004). A formação de sabões, para além de resultar no consumo do catalisador alcalino pode, também, levar à formação de emulsões que criam dificuldades na recuperação e purificação do biodiesel. Desta forma, são utilizados óleos vegetais com um teor inferior a 0,5% de ácidos gordos livre para produções industriais, o que resulta num aumento nos custos de matéria-prima que deve ser de elevada qualidade (Al-Zuhair, 2007).

b) Transesterificação de catálise ácida

A catálise ácida não é muito utilizada na produção de biodiesel a nível industrial, uma vez que apresenta uma velocidade de reacção relativamente lenta e requer temperaturas elevadas, normalmente acima de 100°C (Meher *et al.*, 2006). Contudo, este processo oferece benefícios no que diz respeito à sua independência do teor de ácidos gordos livres da matéria-prima e consequente ausência de pré-tratamento. Particularmente, este método permite a utilização de óleos com acidez superior a 2% (Al-Zuhair, 2007). Os ácidos geralmente utilizados como catalisadores na transesterificação ácida incluem o ácido sulfúrico, fosfórico, hidróclórico e ácidos sulfónicos orgânicos.

O quadro 2 coloca em evidência as diferenças entre estes dois métodos químicos, anteriormente descritos, através da comparação da produção de biodiesel a partir de óleos vegetais por transesterificação com recurso a catalisador ácido ou básico.

Quadro 2: Comparação entre processos de catálises ácida e básica para produção de biodiesel de óleos vegetais por transesterificação (Al-Zuhair, 2007).

Parâmetros	Método de catálise básica	Método de catálise ácida
Temperatura de reacção (K)	303-338	338
Tempo de reacção (h)	1-6	69
Rendimento de ésteres metílicos (% m/m)	96	90
Remoção de	Metanol, catalisador	Metanol, catalisador
Purificação	Glicerol, sabões	Glicerol
Ácidos gordos livres	Produtos de saponificação	Ésteres metílicos, água

c) Transesterificação por catálise enzimática

Embora a catálise química seja realizada industrialmente em muitos países para produção de biodiesel, devido ao seu alto rendimento, a reacção apresenta algumas desvantagens como o consumo elevado de energia, dificuldade na transesterificação de gorduras com alto teor de ácido gordos livres, dificuldade de recuperação de glicerol, a remoção de sais inorgânicos e água do produto e o tratamento de águas residuais alcalinas são processos complexos e representam em custos adicionais (Ren *et al.*, 2011; Bajaj *et al.*, 2010). Por este motivo, os estudos enzimáticos têm recebido, nos últimos tempos, maior atenção, uma vez que a utilização de biocatalisadores permite condições moderadas de reacção, síntese de ésteres alquilo específicos, fácil recuperação do glicerol e a transesterificação de óleos com alto teor de ácido gordos livres (Ren *et al.*, 2011; Bajaj *et al.*, 2010). Posto isto, com o quadro 3 podemos verificar que a catálise enzimática tem grandes vantagens quando comparada com a alcalina.

Quadro 3: Comparação entre a catálise alcalina e a catálise enzimática para produção de biodiesel (Macedo e Macedo, 2004).

	Catálise alcalina	Catálise enzimática
Temperatura de reacção	60-70°C	30-40°C
Ácidos gordos livres no óleo não refinado	Produtos saponificados	Ésteres metílicos
Água na matéria-prima	Interferência na reacção	Sem influência
Rendimento de ésteres metílicos	Médio	Alto
Recuperação do glicerol	Difícil	Fácil
Purificação de ésteres metílicos	Lavagens consecutivas	Nenhum

Porém, o custo de produção das lipases é consideravelmente maior que dos catalisadores químicos, representando um grande obstáculo à sua utilização. Este custo pode ser contornado através da produção de lipases de alta produtividade, selectividade e estabilidade operacional e da imobilização das mesmas, viabilizando a sua reutilização seguida em várias reacções (Macedo e Macedo, 2004; Modi *et al.*, 2007).

2.1.4.3. Processo de purificação do biodiesel

Quaisquer que sejam as condições aplicadas na reacção de transesterificação, esta nunca é completa ocorrendo contaminações dos ésteres, o que pode significar a existência no produto final de triacilgliceróis que não reagiram, álcool, catalisador, sabões e/ou glicerol. Por este motivo, para se obter um biodiesel de acordo com a Norma Europeia EN14214, é necessária uma etapa de purificação posterior ao processo que garanta uma percentagem mínima de 95,5% de ésteres metílicos no produto final.

São muitos os processos de purificação que podem ser aplicados, desde os químicos aos físicos. No entanto, neste trabalho, será apenas feita referência a um dos processos mais utilizados.

Como mencionado, do processo de transesterificação resultam duas fases líquidas: os ésteres metílicos e a glicerina. A glicerina ($\rho = 1,2613 \text{ g/cm}^3$ a 20 °C) apresenta uma densidade diferente da dos ésteres ($\rho = 0,879 \text{ g/cm}^3$ a 20 °C), o que permite que seja separada através de centrifugação depositando-se na camada inferior. Uma vez que a centrifugação se torna mais dispendiosa, embora mais rápida,

a separação pode ser efectuada por decantação onde o produto mais denso, a glicerina, é separado por gravidade do menos denso, os ésteres (Majer *et al.*, 2007). Este processo simples pode ser aplicado porque a glicerina arrasta consigo a maior parte do sabão, catalisador e álcool. Quaisquer restos destes compostos indesejáveis e prejudiciais que fiquem aliados aos esteres metílicos são removidos com uma lavagem, realizada seguidamente (Majer *et al.*, 2007). Por fim, o biodiesel deve ser seco de forma a remover toda a água e, em certos casos, destilado a vácuo para se obter um produto de maior pureza antes de armazenado (Majer *et al.*, 2007). O quadro 4 apresenta as características que o biodiesel para veículos deve apresentar de acordo com os Padrões de biodiesel nos Estados Unidos da America (ASTM D-6751) ou os Padrões na Europa (EN 14214).

Quadro 4: Especificações do biodiesel para veículos de acordos com os Padrões Americanos (ASTM D-6751) ou os Padrões Europeus (EN 14214) (Robles-Medina *et al.*, 2009).

Propriedades	ASTM D-6751			EN 14214		
	Limites	Métodos de teste	Unidades	Limites	Métodos de teste	Unidades
Viscosidade cinemática (40°C)	1,9-6,0	D 445	mm ² /s	3,5-5,0	EN ISO 3104	mm ² /s
Densidade (15°C)	-	-	-	860-900	EN ISO 3675/ EN ISO 12185	Kg/m ³
Teor em ésteres	-	-	-	96,5 min.	prEN 14103	% Massa
Número de cetano	47 min.	D 613	-	51 min.	EN ISO 5165	-
Ponto de inflamação	130 min.	D 93	°C	120 min.	ISO/CD 3679	°C
Ponto de névoa	relatório	D 2500	°C			
Água	0,050 ^a máx.	D 2709	% volume	500 máx.	EN ISO 12937	mg/kg
Cinzas sulfatadas	0,02 máx.	D 874	% massa	0,02 máx.	ISO 3987	% massa
Enxofre	0,05 máx.	D 5453	% massa	10,0 máx.	DIN 51680	mg/kg
Corrosão do cobre	Nº3 máx.	D 130	-	Nº1 (3h a 50°C)	EN ISO 2160	-
Resíduos de carbono	0,050 ^b Max.	D 4530	% massa	0,3c máx.	EN ISO 10370	% massa
Índice de acidez	0,8 máx.	D 664	mg KOH/g	0,5 máx.	prEN 14104	mg KOH/g
Glicerol livre	0,02 máx.	D 6584	% massa	0,02 máx.	prEN 14105	% massa
Glicerol total	0,24 máx.	D 6584	% massa	0,25 máx.	prEN 14105	% massa
Teor de fósforo	0,001 máx.	D 4951	% massa	10 máx.	prEN 14107	mg/kg
Índice de iodo	-	-	-	120 máx.	prEN 14111	-
Estabilidade oxidativa (110°C)	-	-	-	6 min.	prEN 14112	h
Monoacilgliceróis	-	-	-	0,8 máx.	prEN 14105	% massa
Diacilgliceróis	-	-	-	0,2 máx.	prEN 14105	% massa
Triacilgliceróis	-	-	-	0,2 máx.	prEN 14105	% massa
Temperatura de destilação	360d Max.	D 1160	°C	-	-	-

^a inclui sedimentos; ^b 100% das amostras; ^c 10% das amostras; ^d 90% recuperado

A glicerina romovida é neutralizada com um ácido, de modo formar sais, e evaporada, para que seja separada de parte da água que traz arrastada. A glicerina, nesta fase, apresenta uma composição de cerca de 85% (m/m) e os restantes 15% são, maioritariamente, compostos por água (Carmona e Correia, 2009). Esta glicerina é denominada glicerina de grau industrial e é vendida para unidades de purificação que permitiram que esta seja utilizada em áreas tão distintas como a indústria de polímeros e a indústria farmacêutica (Carmona e Correia, 2009).

2.2. O CARDO - *Cynara cardunculus* L.

2.2.1. Caracterização da planta

O cardo é originário da região mediterrânea e Norte de África, sendo já conhecido nas antigas civilizações. Actualmente, pode ser encontrado espontaneamente em países do Mediterrâneo, na zona continental e ilhas, como é o caso do sul de Portugal e Espanha e ilhas dos Açores e Canárias, uma vez que esta planta está bem adaptada a este clima que favorece o seu crescimento selvagem (Bassan *et al.*, 1996; Encinar *et al.*, 1999).

O cardo pertence à família *Asteracea*, na qual se encontra a alcachofra e o girassol, e à espécie *Cynara cardunculus* L. É uma planta herbácea perene, que possui uma grande capacidade regenerativa, secando completamente no verão e rebentando com as primeiras chuvas de outono. Este pode atingir mais de 1,50 metros de altura e possui uma raiz muito espessa e profunda que lhe permite uma boa extracção de água e nutrientes de zonas do solo muito profundas (Bassan *et al.*, 1996). As folhas são verdes na página superior e brancas na página inferior e muito largas, o involúcro, de forma globoso-ovóide, é composto por brácteas ovadas terminadas num espinho e a corola pode ser azul, lilás ou esbranquiçada (Fig.8) (Bassan *et al.*, 1996; Quilhó *et al.*, 2004). O cardo desenvolve-se em terrenos de textura argilosa, pedregosos, bordos das estradas, em lugares incultos e ladeiras e com um pH entre 6,5-8 (Quilhó *et al.*, 2004). O cultivo tradicional desta espécie utiliza 2kg por ha de sementes para um espaçamento de 1m x1m (Gominho e Pereira, 1995).



Fig.8 – Flor de cardo (<http://ealeixo.blogspot.com/>)

O cardo pode ser cultivado como hortícola em certas zonas, mas é uma planta que pode ser aproveitada no seu todo para diversos fins. Nomeadamente, as suas folhas podem ser consumidas cozidas ou utilizadas em medicina natural, em perturbações digestivas, redução do colesterol ou, mesmo, doenças de fígado. As suas flores são, tradicionalmente, usadas no fabrico de queijos artesanais (e.g. Serra

da Estrela e Azeitão), uma vez que possui enzimas coagulantes chamadas cardosinas. Actualmente, vemos a sua utilização vocacionada para a produção de energia, aquecimento, electricidade e biodiesel. O seu grande potencial para fins energéticos resulta de uma produção de biomassa total que pode chegar a 20-30 toneladas de matéria seca por hectare/ano, só na Península Ibérica, e de cerca de 2000-3000 kg de sementes (Bassan *et al.*, 1996).

As sementes de cardo possuem um teor de óleo de cerca de 25%, no qual o ácido linoleico é o principal constituinte, seguido pelos ácidos oleico e palmítico. Estas e outras propriedades do óleo de sementes de cardo são apresentadas no quadro 5.

Quadro 5: Propriedades do óleo de cardo (Fernández e Curt, 2004).

Índice de refração	1,47
Índice de iodo	125
Índice de saponificação	186,6
Índice de peróxidos (meq O ₂ /kg)	4,77
Matéria insaponificável (%)	1,87
Composição em ácidos gordos (%)	
Ácido Palmítico C16:0	10,7
Ácido Estérico C18:0	3,7
Ácido Oleico C18:1	25,0
Ácido Linoleico C18:2	59,7

2.2.2. Produção de biodiesel a partir de sementes de cardo

Desde da década de 80 do século XX que são realizados estudos que comprovam a viabilidade do cardo como cultura energética em vários países do mediterrâneo (Fernández e Curt, 2004). Em 1996, Bassan *et al.*, afirmaram que o óleo de cardo possuía características adequadas para a realização da reacção de transesterificação, produzindo um biodiesel com propriedades semelhantes às do diesel nº2. Como forte impulso para o estudo desta planta, na produção de biocombustíveis, associa-se um alternativa potencial para a lavoura em terrenos abandonados, boa adaptação ao clima mediterrâneo, bem como os custos, substancialmente mais baixos, de produção do óleo de cardo, em comparação com outros óleos convencionalmente utilizados como matéria-prima para produção de biodiesel (Fernández e Curt, 2004).

Mais tarde, Fernández e Curt (2004) apresentaram um estudo sobre a produção de ésteres metílicos (EMAG) e etélicos (EEAG), provenientes de reacções de transesterificação, com recurso a catalise química, a partir de óleo de cardo. Os resultados obtidos reforçam os estudos até então realizados concluindo-se que ambos os ésteres formados são potencialmente adequados para biocombustíveis como

apresentado no quadro 6. Sengo *et al.* (2010) otimizaram a produção de biodiesel a partir de óleo de cardo bruto, por catálise alcalina, e implementaram-na à escala piloto

Quadro 6: Propriedades dos ésteres etílicos e metílicos obtidos de óleo de sementes de cardo para a produção de biodiesel (EN-14214)

Propriedades	Ésteres Etílicos	Ésteres Metílicos	EN-14214
Densidade a 15°C (g/cm ³)	0,8794	0,8890	0,86-0,90
Viscosidade a 40°C (mm ² /s)	4,479	5,101	3,5-5
Ponto de inflamação (°C)	184	182	>101
Turvação (°C)	-5	-4	--
Ponto de obstrução do filtro a frio (°C)	-10	-10	≤ -10 **
Número de cetano	66	59	>51
Resíduos de carbono (% m/m) (10% residuo de destilação)	0,28	0,36	<0,3
Índice de iodo	109	117	<120 (140*)
Fósforo (mg/kg)	<5	<5	<10
Enxofre (% m/m)	<0,02	<0,02	<0,02

*140 é o máximo de índice de iodo permitido em Espanha

** Condições climáticas de Espanha

2.3. AS ENZIMAS

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza proteica constituídas por longas cadeias de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas, segundo um arranjo tridimensional. Apresentam uma elevada eficiência catalítica e especificidade em condições operatórias suaves, como temperatura, pressão e pH próximo neutro, o que permite realizar transformações químicas complexas mesmo quando em pequenas quantidade (Castro, 2003)

2.3.1. Obtenção de enzimas

No início do século XX foram dados largos passos no campo da tecnologia enzimática com a classificação, purificação e isolamento de diversas enzimas. Estes avanços permitiram que, no início da década de 80 desse século, começassem a ser realizadas, a nível industrial, técnicas de modificação genética para produção de enzimas, de forma a melhorar a sua eficiência e qualidade possibilitando a actual aplicação em diversos campos (Castro, 2003).

As enzimas aparecem na natureza em animais, vegetais e microrganismos. Contudo, são as fontes microbianas que possuem maior relevância a nível industrial estando estas enzimas divididas em duas categorias: as extracelulares e as intracelulares. As enzimas microbianas extracelulares são retiradas do meio de cultura e posteriormente purificadas enquanto que as intracelulares distinguem-se por serem retiradas de dentro ou das paredes das células (Robles-Medina *et al.*, 2009). Nos tempos que correm, são produzidas as chamadas enzimas recombinantes, que resultam da incorporação do gene pretendido (produtor da enzima) no microrganismo hospedeiro (Castro, 2003).

2.3.2. Caracterização das enzimas

As enzimas são específicas para um ou vários substratos, uma vez que possuem um local na sua superfície, denominado centro activo, constituído por um arranjo de aminoácidos, que permite a ligação do substrato à enzima e o contacto com o centro catalítico onde ocorre a reacção (Castro, 2003).

As enzimas são catalisadores cuja função é acelerar a velocidade de uma reacção por diminuïrem a energia activação da mesma, sem alterar a termodinâmica

envolvida. Por este motivo, quanto mais baixa for a energia de activação a fornecer, mais eficaz será o catalisador (Fig. 9).

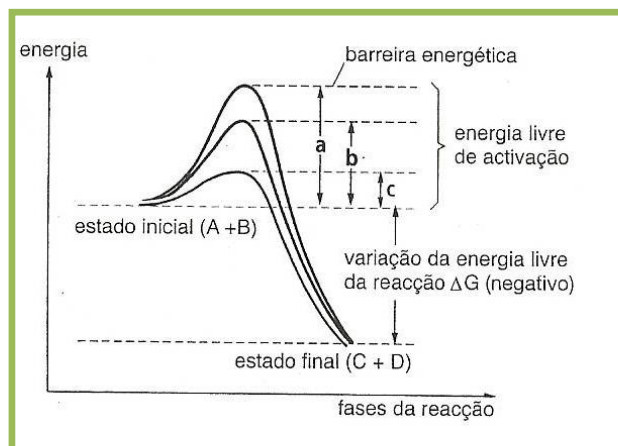


Fig.9 – Energias de activação necessárias para desenvolver uma reacção exergónica: (a) na ausência de catalisador; (b) na presença de catalisador químico; (c) na presença de enzima. (Weil, 2000).

A velocidade de uma reacção enzimática é medida pela quantidade de substrato consumido ou de produto formado por unidade de tempo e é dependente da temperatura e pH a que é realizada (Weil, 2000). Quanto maior for a temperatura aplicada, maior será a velocidade de reacção, até uma temperatura óptima a partir da qual a velocidade começa a diminuir por desnaturação das enzimas (Fig.10). Mudanças extremas de pH podem alterar a estrutura da enzima, em especial do sítio catalítico, devido a uma repulsão de cargas (Fig.11).

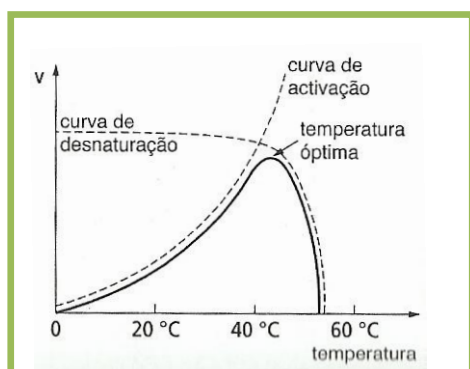


Fig.10 - Influência da temperatura sobre a velocidade de uma reacção enzimática (Weil, 2000).

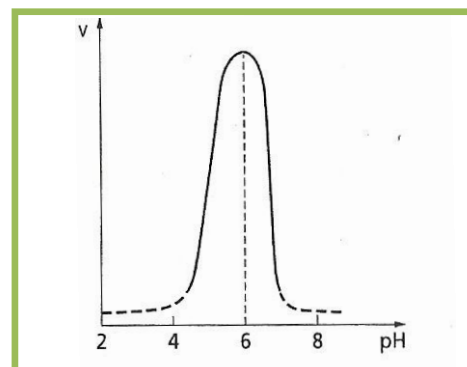


Fig.11 – Variações da velocidade inicial de uma reacção enzimática em função do pH (exemplo da urease) (Weil, 2000).

Contudo, a actividade enzimática pode ser diminuída por compostos inibidores, de uma forma reversível (após a dissociação com o inibidor, a enzima retorna a sua actividade) ou irreversível (modificações químicas da molécula enzimática, levando a

uma inativação definitiva). No caso da inibição reversível, esta pode ser de três tipos (Castro, 2003; Weil, 2000):

- Competitiva – quando o inibidor compete com o substrato pelo centro activo da enzima, uma vez que apresentam estruturas semelhantes. A inibição depende da concentração e afinidade respectivas da enzima para o substrato e para o inibidor.
- Não competitiva – quando o inibidor se liga à enzima num sítio próprio, podendo estar ligado ao mesmo tempo que o substrato. A inibição, neste caso, depende da concentração do inibidor e da sua afinidade com a enzima.
- Mistos – provocam a diminuição simultânea da afinidade da enzima para o substrato e a velocidade máxima.

As enzimas são classificadas de acordo com o composto sobre o qual actuam ou o tipo de reacção que catalisam, contendo sempre a terminação “ase” na sua nomenclatura. Devido ao numero de enzimas conhecidas, a União Internacional de Bioquímica (IUB) criou um sistema de divisão onde estabeleceu 6 classes de enzimas, de acordo com o tipo de reacção química que catalisam (Castro, 2003; Weil, 2000):

1. Oxirredutases: catalisam reacções de oxi-redução, ou seja, transferência de electrões.
2. Transferases: transferência de grupos químicos entre moléculas.
3. Hidrolases: catalisam reacções de hidrólise de ligações covalentes.
4. Liases: Formam ou destroem ligações duplas, respectivamente retirando ou adicionando grupos funcionais
5. Isomerases: Catalisam reacções de interconversão entre isómeros ópticos ou geométricos.
6. Ligases ou sintetases: Formação de novas moléculas por ligação de duas já existentes, consumindo energia sob a forma de ATP.

Por sua vez, a Comissão das Enzimas (EC:Enzyme Commission) determinou uma classificação mais precisa com uma nomenclatura sistemática, com as 6 classes divididas em sub-classes numeradas, com formato EC X.Y.W.Z, conforme o tipo de reacções químicas que catalisam. Como exemplo, a lipase possui a nomenclatura EC3.1.1.3. e o seguinte significado:

3. Hidrolases

3.1. Corta as ligações éster

3.1.1. Carboxiléster-hidrolases

3.1.1.3. Lipases

2.3.3. Imobilização de enzimas

Comparativamente com as enzimas imobilizada em suporte sólido, as enzimas livres são mais fáceis de preparar e apresentam um custo de preparação muito mais baixo. No entanto, as enzimas na forma solúvel só têm uma única utilização. Por esta razão, é economicamente mais vantajosa a imobilização das enzimas tornando-as uma fase independente no sistema reaccional e possibilitando a sua recolha e reutilização (Al-Zuhair, 2007). Castro (2003) apresenta, resumidamente, as seguintes vantagens e desvantagens da utilização de imobilização:

- Vantagens:
 - Retenção do biocatalisador no reactor;
 - Elevada concentração de catalisador no reactor;
 - Controlo do microambiente;
 - Facilidade de recuperação e reutilização do catalisador, o que reduz os custos das enzimas;
 - Possibilidade de ser utilizado em sistemas contínuos.
- Desvantagens:
 - Perdas de capacidade catalítica durante a imobilização;
 - Problemas de transferência de massa interna no caso de suportes porosos;
 - Separação física entre o catalisador e o fluido, podendo ocorrer degradação mecânica e libertação de partículas finas;
 - Tempos de reacção mais longos.

Existe uma ampla escolha que tem de ser ponderada, desde os materiais a utilizar como suportes de imobilização até às condições utilizadas durante o processo, que tornam difícil definir quais as técnicas e suportes a utilizar. Não existindo um método geral de imobilização ou suporte universal, deve ser procurada a melhor imobilização que permita que as enzimas sejam alojadas dentro ou à superfície de um

suporte de imobilização de modo a que actividade catalítica não seja afectada negativamente.

Existem vários métodos de imobilização de enzimas que podem ser divididos em três grupos principais:

1. Ligação a um suporte insolúvel em água;
2. Ligações intermoleculares de enzimas, por uso de reagentes bi- ou multifuncionais;
3. Aprisionamento, isto é, incorporação das enzimas em matrizes de géis ou microcápsulas (Castro, 2003).

2.3.4. As Lipases

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam em meio aquoso a hidrólise de óleos e gorduras com consequente libertação de ácidos gordos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Villeneuve *et al.*, 2000). A nível industrial, estas enzimas são produzidas em diversos microrganismos intra e extracelular como é o caso de leveduras, como *Candida rugosa* e *Candida parapsilosis*, fungos, como *Rhizopus oryzae* e *Rhizomucor miehei*, e bactérias, como *Bukholdeira cepacia* e *Pseudomonas alcaligenes*.

As lipases variam consoante a sua regio-selectividade para a posição do éster primário, existindo dois tipos deste enzima: a *sn*-1,3-lipase, que hidrolisa as ligações éster na posição *sn*-1 e *sn*-3 do triacilglicerol, e a lipase não selectiva, que ataca a ligação éster nas posições *sn*-1(3) ou *sn*-2. As lipases permitem a catálise de reacções de hidrólise em meio aquoso, a nível da interfase água/óleo, mas também de reacções em meio orgânico como a esterificação, transesterificação e interesterificação.

O poder catalítico das lipases faz com que estas sejam, actualmente, utilizadas em diversos processos como é o caso da produção de alimentos, fármacos, cosméticos, detergentes, têxteis, indústria química dos óleos ou produção de biodiesel (Neugnot, 2002). Bajaj *et al.* (2010), na sua revisão sobre a produção de biodiesel, referem que as características mais desejadas das lipases são a sua capacidade de utilizar todos os mono, di e triacilgliceróis bem como os ácidos gordos livres na transesterificação, a baixa inibição pelo produto, a alta actividade e rendimento em meios não aquosos, o baixo tempo de reacção, a reutilização da enzima imobilizada, a temperatura e a resistência ao álcool.

Nos últimos anos realizaram-se diversos estudos de aplicação de enzimas como catalisadores na produção de biodiesel, a partir de diferentes óleos, procurando-se superar as limitações existentes e otimizar os processos. As lípases microbianas, extraídas de diferentes fontes, têm sido aplicadas com sucesso como catalisador de transesterificação para produção de biodiesel. Bajaj et al. (2010) apresentam na sua revisão alguns exemplos de lípases aplicadas com sucesso a diferentes óleos e álcoois para produção de biodiesel, demonstrado aqui no quadro 7.

Quadro 7: Comparação da actividade de transesterificação de diferentes lípases em diferentes substratos para produção de biodiesel (Bajaj et al., 2010).

Óleos	Enzimas	Álcool	Condições óptimas	Meio de imobilização	Rendimento máximo	Outros detalhes
Jatropha	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Etanol	40°C, 10h, 200rpm		92%	Conteúdo em água 0,5%
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Etanol	40°C, 24h, 200rpm	-	79%	Pré-tratamento ultra-sons 110W, 2-3h
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Metanol	30°C, 60h, 200rpm	Sílica	94%	Uso de n-butanol como solvente
Sebo	<i>Mucor miehei</i>	Metanol	45°C, 5h, 200rpm	-	98,4%	Solvente hexano
		Etanol			98,3%	
		Propanol			98,6%	Uso do hexano como solvente, adicionado 6mol% água nos triglicéridos
		Butanol			99,6%	Utilização de hexano como solvente
		Isobutanol			99,4%	Uso do hexano como solvente, adicionado 6mol% água nos triglicéridos
Óleo de soja	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Metanol (adição gradual)	40°C, 5h, 200rpm	Sílica gel	>90%	1:1 razão molar de metanol em óleo, 10% lipase
	<i>Mucor miehei</i>	Etanol	45°C, 5h, 200rpm	-	97,4%	Solvente hexano
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (B68 tensão psicrófila)	Metanol (adição gradual)	20°C, 12h, 180rpm	Tecidos de celulose	92%	Solvente n-heptane
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Etanol (razão molar inicial em óleo 3:1)	70°C, 24h, 180rpm	-	71%	Solvente iso-octano, AK lipase solubilizada
		Metanol (razão molar inicial em óleo 3:1)	40°C, 72h, 200 rpm	-	83,8%	5mmol/L Ca ²⁺ , 5% água
	<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme IM-77)	Metanol	36.5°C, 6.3h, 200 rpm	Fracas esferas aniónicas de resinas macroporosas	92,2%	Solvente n-hexano, conteúdo em água 5,8%, razão molar de metanol em óleo 3,4:1

Mistura de óleo de soja e colza	<i>Candida antarctica</i>	Metanol (adição gradual)	30°C, 48h, 130rpm	SM-10	98,4%	Conteúdo em água <400ppm
Óleo de girassol	<i>Cândida antárctica (Novozyme 435)</i>	Metanol (adição continua)	50°C, 15h, 130rpm	Suporte resina macroporosa, diâmetro 0,3-0,9mm	97%	Conteúdo em água 400ppm
Óleo de cozinha usado	<i>B. subtilis 1,198</i>	Metanol (adição gradual)	40°C, 72h, 220rpm, pH6,5	Suporte hidrofóbico com partículas magnéticas (Fe ₃ O ₄)	90%	-

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Sementes e óleo

As sementes de cardo, das quais se obteve o óleo para a produção de biodiesel (EMAG), foram fornecidas pelo Campo Pedagógico de Plantas Bioenergéticas, BioenerglSA, do Instituto Superior de Agronomia. Estas provêm de duas colheitas diferentes, realizadas em 2007 e 2009.

O óleo de cardo foi obtido por extracção mecânica das sementes numa prensa. Após a extracção, este óleo foi centrifugado e filtrado para eliminar partículas sólidas em suspensão. Os óleo de sementes de cardo colhidas em 2007 contém 4,5% ácidos gordos livres enquanto o óleo de 2009 possui 1,6% de ácidos gordos livres na sua composição.

3.1.2. Lipase/aciltransferase

Utilizou-se a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, liofilizada, patenteada pela BASF e produzida pelo grupo do Prof. Eric Dubreucq, de Montpellier SupAgro, Montpellier, França. Trata-se de uma enzima com propriedades não usuais, uma vez que em meio aquoso catalisa preferencialmente a alcoólise relativamente à hidrólise. Assim, esta enzima será testada em meios bifásicos orgânico/aquoso.

3.1.3. Reagentes

- ✓ Accurel MP1000;
- ✓ Ácido acético, da Panreac Química S.A.;
- ✓ Éter de petróleo 40-60°C, da Panreac Química S.A.;
- ✓ Éter etílico, da J. T. Baker;
- ✓ Eupergit C 250L;
- ✓ Glutaraldeído;
- ✓ Metanol, da Sigma – Aldrich.
- ✓ Metóxido de sódio, da Aldrich, com um grau de pureza de 25% e 30% (m/v metanol)
- ✓ *n*-hexano 95%, da J. T. Baker;

Os restantes solventes utilizados foram de grau *p.a.* e obtidos de diferentes fontes.

3.1.4. Equipamentos e utensílios

- ✓ Prensa mecânica “Täby Press type 20”, da Skeppsta Maskin AB, Suécia;
- ✓ Placas de agitação magnética, Variomag/Compact;
- ✓ Reactores de vidro de parede dupla com capacidade de cerca de 25 mL e 30 mL;
- ✓ Placas de Sílica Gel 60 com 0,25 mm espessura e de 20x20 cm de área da marca Macherey-Nagel;
- ✓ Tina cromatográfica, de vidro 22x20x10 cm;
- ✓ Seringa 100µL da Hamilton Bonaduz;
- ✓ Aparelho para medição de áreas da Leica Microsystems;
- ✓ Evaporador Rotativo de Vácuo, Rotavapor R-200, da Büchi;

3.2. Métodos

3.2.1. Extração mecânica do óleo

O óleo de cardo da colheita de 2009 foi disponibilizado pelo Campo Pedagógico de Plantas Bioenergéticas, BioenergISA, do Instituto Superior de Agronomia já extraído das sementes. Contudo, é de salientar que o processo pelo qual foi obtido o óleo é exactamente o mesmo que será em seguida referido para as sementes de 2007, inclusive foi realizado no mesmo equipamento.

Assim sendo, o óleo das sementes de cardo (cerca de 22%, base seca) foi extraído por um processo físico por prensa mecânica, modelo “Täby Press type 20” (fig.12), uma vez que deste modo se consegue obter um rendimento de cerca 74% relativamente à extração por solvente em aparelho de Soxhlet (Sengo *et al.*, 2010). Comparativamente, optar por um processo de extração por solvente representaria um maior rendimento de extração mas com maiores custos de reagente e morosidade do processo.



Fig.12 – Prensa mecânica modelo “Täby Press type 20”.

O equipamento de extracção mecânica referido é indicado para extracções domésticas de oleaginosas com um teor de humidade de 7-9%. A sua utilização está limitada a pequenas quantidades de sementes por operação, uma vez que no decorrer do processo ocorre a deposição de resíduos sólidos nas paredes do equipamento e um excesso de sementes levariam ao encravamento da mesma.

3.2.1.1. Descrição do equipamento

A prensa, modelo “Täby Press type 20”, tem como base uma caixa eléctrica isolada, que requer 200 V de energia, à qual se junta o corpo central que permite a ligação das restantes componentes necessárias à realização do processo. No corpo central, é colocado um parafuso sem-fim, um anel de aquecimento e um funil (fig.13). O parafuso sem-fim é adicionado no interior do corpo e realiza a moenda das sementes através da deslocação e compressão contra as paredes que o envolvem. O aquecimento é inserido por um anel mas alonga-se à totalidade de corpo central de modo a facilitar a extracção; este alcança temperaturas na ordem dos 100°C e é controlado por um painel externo. Por seu lado, o funil serve para adicionar as sementes ao processo através da parte de cima do corpo de modo a que estas sejam conduzidas ao longo do parafuso sem-fim.



Fig.13 – Corpo central, funil e sistema de aquecimento da prensa
(<http://www.oilpress.com/kit202.jpg>)

Na extremidade do parafuso sem-fim é acrescentado uma tubeira (“nozzle”) que, conforme a abertura, condiciona o tempo que a semente permanece na prensa e, consequentemente, o grau de extracção. Os “nozzles” existentes variam num calibre de 4 a 9 mm. No entanto, para as sementes de cardo o “nozzle” recomendado é o de 9 mm (Sengo, 2010). Não se opta por “nozzles” de menor calibre porque estes

levantam problemas de funcionamento da prensa embora, na teoria, pudessem significar maior rendimento de extracção. O “nozzle” é fixado no parafuso sem-fim com o auxílio de uma rosca que se liga ao corpo central (fig.14).



Fig.14 – Constituintes da prensa: parafuso sem-fim, “nozzle” e rosca de saída

Da extracção mecânica, resultam duas fases: óleo e o bagaço (Fig.15). O óleo cai por gravidade através de orifícios no meio da estrutura do corpo central, enquanto que o bagaço sai na extremidade depois do nozzle.



Fig15 – Prensa em funcionamento com saída de óleo e bagaço.

3.2.1.2. Operação de extracção

Começou-se por montar o equipamento conforme descrito anteriormente, salientando-se a utilização de “nozzle” de 9mm indicado para extração do óleo de sementes de cardo. O aquecimento, por intermédio do anel aplicado à prensa, deve ser ligado cerca de 3-5 minutos antes do início da extracção de modo a ser alcançada a temperatura necessária para realização da operação.

Adicionou-se gradualmente cerca de 1kg de semente através do funil no topo da prensa. As sementes seguem pelo parafuso sem-fim onde a força física e temperatura permitem que em breves instantes se obtenha as primeiras gotas de óleo.

No final do processo, obteve-se um óleo turvo e um bagaço compactado e expelido na forma de cilindro.

Quando a moenda acabou desligou-se o equipamento, dando-se um tempo suficiente para que arrefeça antes de se começar a desmontar. O rendimento de semente moída nunca é 100%, uma vez que uma parte destas fica no interior do equipamento sem chegar a ser moída. Para limpar o equipamento é utilizada uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 2% (m/v) para retirar as incrustações.

3.2.2. Determinação da acidez dos óleos

A determinação da acidez foi realizada segundo a norma Portuguesa NP-903 (1972) para Gorduras e Óleos Comestíveis. Resumidamente, este processo consiste na neutralização dos ácidos gordos livre de uma toma de óleo dissolvido numa mistura éter etílico/álcool etílico (1:1, v/v), por intermédio duma solução alcalina titulada de NaOH a 0,1N. A titulação é realizada até a solução adquirir o tom rosado devido à prévia adição do indicador fenolftaleína.

A acidez do óleo, expressa em ácido oleico, é determinado através da seguinte expressão:

$$\frac{2,82 \, v}{m} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde v é o volume da solução alcalina 0,1N gasto na titulação (cm^3) e m representa a massa da toma de óleo (g).

A determinação da acidez serviu para conhecer a percentagem de ácidos gordos livres presentes no óleo bruto.

3.2.3. Imobilização da enzima

3.2.3.1. Preparação de solução tampão de fosfato pH 6,5 para imobilização da enzima

Esta solução tampão é preparada a partir das soluções seguintes:

- Solução aquosa de Na_2HPO_4 , MM = 141,96 g/mol
- Solução aquosa de NaH_2PO_4 , MM = 137,98 g/mol

Para a sua preparação, pesaram-se 7,11g de Na_2HPO_4 e 5,999g de NaH_2PO_4 em dois balões volumétricos de capacidade 250mL. A dissolução dos reagentes deve ser realizada com água destilada até se obterem os volumes definidos. O volume dos balões individuais deve ser transposto para um único de capacidade 500mL. Por fim, mede-se e ajusta-se o pH, se necessário, para um valor de 6,5.

3.2.3.2. Imobilização da enzima em suporte Accurel MP1000

O Accurel MP1000 é uma resina sintética hidrofóbica composta por polipropileno em pó. Uma vez que é insolúvel em água, humedece-se o suporte com etanol (numa proporção de 7ml etanol por 1g accurel) de modo a excluir o ar contido nas partículas. Utilizaram-se 0,5g de suporte para cada ensaio, independentemente da quantidade de enzima imobilizada, o que significou a adição de 3,5ml de etanol. Depois de 15 minutos em contacto, remove-se o etanol do suporte com o auxílio de uma pipeta.

Em seguida, dissolveu-se a quantidade pretendida de enzima em 50mL de solução tampão fosfato a pH 6,5 (*cf em 5.2.3.1.*) num balão de Erlenmeyer, ao qual se adicionou o suporte, e ficando sob agitação magnética moderada durante 18 horas.

Passado este tempo de contacto, filtrou-se a mistura a vácuo de modo a separar o imobilizado (suporte com enzima) do tampão. O imobilizado é novamente colocado no balão de Erlenmeyer adicionando-se 25mL de solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão (6mL de solução de glutaraldeído + 54mL tampão = 60ml). Coloca-se mais uma vez sob agitação magnética durante 2 horas, ao fim das quais se filtra novamente.

A enzima imobilizada em Accurel MP 1000 fica depositada no filtro, sendo lavada com 50mL de solução tampão fosfato por duas vezes. Para terminar, deixou-se secar ao ar durante cerca de 5 minutos.

3.2.3.3. Imobilização da enzima em suporte Eupergit C

A Eupergit C é um suporte que consiste em microesferas macroporosas no qual a enzima pode ser imobilizada. Contrariamente à preparação da imobilização da enzima em Accurel MP1000, esta não necessita de agitação magnética e a imobilização decorre à temperatura ambiente.

Começou-se por pesar a quantidade de enzima desejada para um balão de Erlenmeyer. Seguidamente, adicionaram-se 12mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH 6,5 (*cf em 5.2.3.1.*) e agitou-se de modo a homogeneizar o conteúdo. Feito isto, adicionaram-se 2g de suporte Eupergit C, voltando-se a homogeneizar de modo a garantir o envolvimento correcto dos constituintes.

No processo de imobilização, deve-se deixar a enzima em contacto com o suporte, sem agitação, durante 96h num local abrigado da luz. Decorrido este tempo, filtra-se a vácuo e lava-se a preparação imobilizada com 50mL de tampão fosfato (*cf em 5.2.3.1.*), fraccionando-se em três porções. Para finalizar, basta deixar secar o imobilizado ao ar.

3.2.3.4. Preparação de solução tampão de fosfato pH 6,5 com 4M de metanol para conservação de enzima imobilizada

Esta solução tampão é semelhante à solução tampão de fosfato pH 6,5 para imobilização da enzima (*cf em 5.2.3.1.*) mas, em vez de se completarem os 500mL somente com água destilada são adicionados 64,08mL de metanol (4M). Tal como anteriormente, no final mede-se e ajusta-se o pH, se necessário, para um valor de 6,5.

3.2.4. Produção de biodiesel

Os ésteres metílicos de ácidos gordos (biodiesel) foram obtidos a partir do óleo de cardo, num sistema bifásicos orgânico/aquoso, por reacções de transesterificação catalisadas pela lipase/aciltransferase, na forma livre e imobilizada em diferentes suportes.

3.2.4.1. Preparação de solução tampão de fosfato pH 6,5, 50 mM para reactor (meio aquoso)

Esta solução tampão é preparada a partir das soluções seguintes:

- Solução aquosa de KH_2PO_4 , 0,1M, MM = 136,09 g/mol
- Solução aquosa de NaOH, 0,1M, MM = 39.9971 g/mol

Para preparar esta solução tampão, pesaram-se 1,3609g de KH_2PO_4 para um balão volumétrico de 100ml e 0,2g de NaOH para um balão de 50ml. Em ambos os

casos, completou-se o volume com água destilada. Depois de devidamente dissolvidas, as soluções são passadas para um único balão de capacidade 200mL perfazendo-se o volume com água destilada até ao menisco. Feito isto, mede-se e acerta-se o pH, se necessário, para um valor de 6,5.

3.2.4.2. Modo de operação

Os ensaios de produção de biodiesel foram realizados à pressão atmosférica, em reactores cilíndricos de vidro de parede dupla, a uma temperatura de 40°C e sob agitação magnética (fig.16).

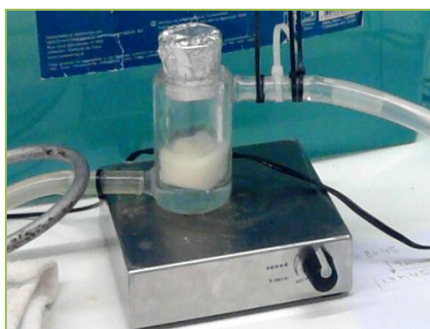


Fig.16 – Reactor de vidro de parede dupla em cima do agitador magnético

A temperatura de reacção é alcançada através da circulação de água quente no interior das paredes duplas dos reactores. A água é proveniente de um banho termostatzados (fig.17), num circuito fechado constante, que permite a programação para 40°C a que decorrem todas as reacções.



Fig.17 – Banho termostatzado

Os ensaios foram preparados com um meio reaccional constituído por: óleo, catalisador, álcool e meio aquoso nas correctas proporções, determinadas em função das razões molares e da capacidade dos reactores utilizados (Anexo I). Estes ensaios foram realizados com os dois óleos de diferente acidez.

Na maioria dos ensaios realizados utilizaram-se reactores com capacidade útil de 15mL, e o meio reaccional era constituído pelo seguinte sistema bifásico: 2mL de óleo de cardo, 0,8mL de metanol (2M num sistema bifásico) e 8mL de solução tampão (*cf em 5.2.4.1.*) numa razão molar de 0,2:2:5, respectivamente. A quantidade de enzima variou em função do ensaio em curso, bem como o seu estado, isto é, foram realizados ensaios com enzima livre e outros com enzima imobilizada em diferentes suportes. É de salientar que a quantidade de enzima nunca foi inferior a 200mg/L no meio reaccional.

Os reactores, depois de devidamente preparados, são tapados com uma rolha forrada com alumínio de forma a minimizar as oxidações e evaporação de metanol. O tempo de cada reacção variou conforme o ensaio, tendo numa primeira fase a duração de 6 horas que se aumentou para 48 hora, o que permitiu uma maior recolha de dados, no tempo, de produção de ésteres metílicos de ácidos gordos.

Alguns ensaios com enzima imobilizada em Accurel MP1000 e eupergit C foram realizados em reactores de maior capacidade (25mL), adaptando-se as quantidades de meio reaccional para 5mL de óleo, 1,21mL de metanol (razão molar 1:6 óleo/metanol) e 10mL de solução tampão (*cf em 5.2.4.1.*).

Realizou-se, também, um ensaio nestas condições com Accurel MP1000 livre de enzima, de modo a ser analisado o comportamento do suporte no meio, em termos de fenómenos de partição dos reagentes entre o meio reaccional e o suporte.

3.2.4.3. Recolha de amostras

A recolha de amostras foi realizada de dois modos diferentes. O primeiro consistiu na recolha de 0,5mL do meio reaccional ao longo do tempo de reacção. A amostra recolhida foi diluída em 1,5mL n-hexano e 2mL água destilada num tubo de centrifuga. Foi centrifugada a 3500 rpm, durante 10 minutos, permitindo a separação de uma fase sobrenadante, com os monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis, ácidos gordos e os ésteres metílicos, e uma fase inferior, com os componentes hidrossolúveis da reacção (o glicerol, o metanol residual e o catalisador).

O outro modo de recolha de amostras foi realizado para os ensaios com enzima imobilizada em Accurel MP1000 para os tempos 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 30h e 48h, em que cada tempo correspondia ao final de um ensaio. Deste modo foi possível a recolha de amostras de maior representatividade da composição do meio.

Este método consistiu na recolha total do conteúdo do reactor (meio reaccional e enzima) para um balão de Erlenmeyer rolhado ao qual se adicionaram 10mL de *n*-hexano. Agitou-se muito bem a mistura e filtrou-se a vácuo de forma a recuperar a enzima. Tornou-se a lavar a enzima com mais 5mL de *n*-hexano. O filtrado foi centrifugado a 3500 rpm, durante 10 minutos, de forma a separar a fase orgânica e aquosa para análise dos produtos da reacção.

3.2.4.4. Recuperação da enzima imobilizada para reutilização

A recuperação da enzima imobilizada foi realizada porque elas não perdem a actividade catalítica e assim é possível a sua reutilização nos ensaios seguintes, desde que devidamente conservadas.

Como se encontra anteriormente descrito, através da filtração a vácuo separa-se o meio reaccional da enzima imobilizada. A enzima fica depositada no papel de filtro. Esta deve ser lavada com solução tampão contendo 4M de metanol (*cf em 5.2.3.4.*) e depois removida do filtro. Antes de nova utilização, a enzima é guardada em solução tampão com 4M de metanol a 4°C. Para ser novamente utilizada, a enzima imobilizado só necessita de ser filtrada a vácuo para remover o tampão antes de ser colocada no novo meio reaccional.

3.2.5. Análise dos produtos de reacção

Para analisar os produtos de reacção retirou-se uma parte do sobrenadante diluído em *n*-hexano (*cf em 5.2.4.3.*) para análise em cromatografia fina. Foram utilizadas placas de sílica gel dividida, por raspagem, em várias colunas de forma a não ocorrer contaminação das amostras nos diferentes tempos. Em cada coluna fez-se a deposição de um banda contínua de 40µL de solução contendo a amostra.

A primeira coluna de cada placa foi reservada para o tempo zero/óleo servindo como padrão para os restantes tempos. Isto porque o óleo de cardo é formado por monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG), ácidos gordos livre (AGL) e triacilgliceróis (TAG) identificáveis na placa de camada fina segundo esta ordem, da

base para o topo da placa. O que significa que nas restantes amostras, os compostos estarão colocados na mesma linha horizontal ou ausentes quando consumidos. Acima dos triacilgliceróis surgem os ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) pretendidos com este estudo.

Seguidamente, preparou-se um banho para a cromatografia em camada fina fina formado por éter de petróleo, éter etílico e ácido acético, numa proporção de 85:15:1 (v/v/v) respectivamente. Este banho ascende através das placas, de baixo para cima, permitindo a separação das bandas representativas dos componentes presentes. Para identificação das bandas presentes nas placas foi necessário pulverizá-las com uma solução alcoólica de diclorofluoresceína (2% 2':7' – diclorofluoresceína em 95% de etanol) e colocá-las na presença de luz ultravioleta a 366nm.

Por último, marcou-se a lápis as áreas dos diferentes constituintes das colunas segundo a ordem já apresentada: MAG, DAG, AGL, TAG e EMAG, de baixo para cima (Fig.18). A delimitação das áreas a lápis foi realizada de modo a que os compostos presentes se tornassem legíveis sem a presença de luz ultravioleta. Deste modo, as placas de sílica puderam ser fotocopiadas e as áreas dos compostos medidas no equipamento Leica Microsystems disponibilizado pelo Departamento de Engenharia Florestal. Os valores obtidos com esta medição não oferecem uma unidade específica mas permitem determinar as percentagens de cada compostos relativamente uns aos outros.

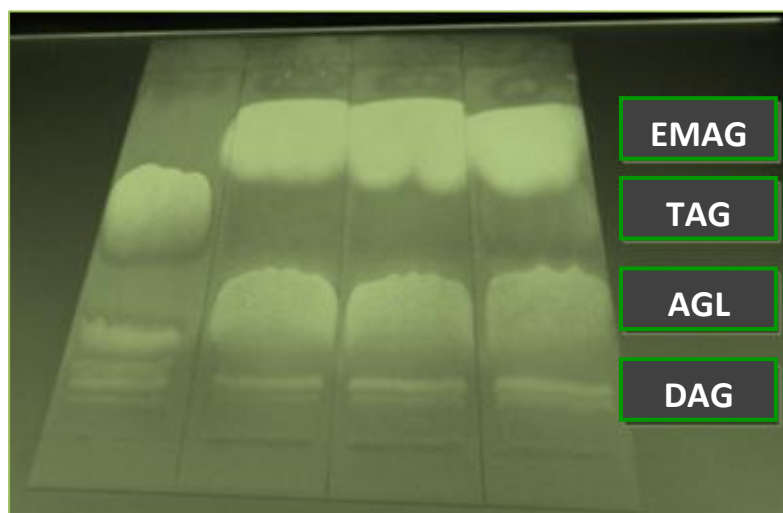


Fig.18 - Exemplo de uma placa de cromatografia em camada fina com as diferentes bandas dos constituintes da amostra: diacilgliceróis (DAG), ácidos gordos livres (AGL), triacilgliceróis (TAG) e ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG)

Após a recolha dos resultados das áreas das placas de cromatografia em camada fina é possível realizar uma relação que determina a evolução de produção de ésteres metílicos de ácidos gordos ao longo do tempo, nos diferentes ensaios. Pois, embora os ensaios tenham decorrido em condições diferentes, foi possível estabelecer um critério para tratamento de dados comum entre eles. É de salientar que os resultados de monoacilgliceróis foram ignorados, devido à sua inconstante presença e baixo significado.

Em primeiro lugar, foi determinada a percentagem de área de cada constituinte, para cada tempo do ensaio, através da relação com o total das áreas de cada coluna das placas cromatograficas correspondente aos diversos compostos aí representados:

$$\% \text{Área do composto} = \frac{\text{área do composto no tempo } t \times 100\%}{\text{área da totalidade dos compostos no tempo } t} \quad (\text{Eq. 2})$$

Seguidamente, foram estabelecidas relações entre os diacilgliceróis (DAG), ácidos gordos livres (AGL), triacilgliceróis (TAG) e ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG), de forma a determinar a sua percentagem mássica ao longo do tempo de reacção para cada um deles. Os modelos de cálculo apresentados em seguida foram adoptados para todos os ensaios.

Começou-se por estabelecer uma relação para as áreas dos ácidos gordos livres (AGL) com base na determinação de acidez (*cf* 5.2.2.). Deste modo, conhecendo-se a acidez sabe-se qual é a percentagem de ácidos gordos livres presentes no óleo, isto é, no tempo zero do ensaio. Pegando nesses dados, com um simples calculo foi possível chegar aos valores de AGL ao longo do tempo:

$$AGL (\%, m/m) = \frac{\% \text{ área no tempo } t \times \% \text{ AGL no tempo zero}}{\% \text{ área no tempo zero}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Nos ensaios com enzima imobilizada em Accurel MP1000 em que a recolha de amostras foi realizado nos tempos 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 30h e 48h com cada tempo correspondendo ao final de um ensaio, foi determinada a acidez obtendo-se uma relação entre a área e os AGL em cada placa.

Para a determinação da percentagem de diacilgliceróis recorreu-se à curva de calibração conseguida por Sengo (2010), através da qual se sabe que por 0,8044mg/100µL (0,08044g/10mL) se obtém uma área de 2,43104 de DAG, pelo que basta estabelecer uma relação com as áreas obtidas para se determinar a percentagem de DAG presente para cada tempo. Para tal, bastou utilizar a seguinte fórmula:

$$DAG (\%, m/m) = \frac{\text{área de DAG no tempo } t \times 0,8044}{2,43104} \quad (\text{Eq. 4})$$

No tempo zero, ou seja, o óleo inicial não possui ésteres metílicos de ácidos gordos pois estes resultam da reacção de transesterificação do óleo com o metanol. Este facto faz com que se saiba que na banda do tempo zero só estão presente os ácidos gordos livres (AGL), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG). Como, com os cálculos acima descritos, já se conhecia a quantidade de AGL e DAG, foi possível estimar a massa de TAG no tempo zero presente em cada tempo, segundo a seguinte subtracção:

$$\%TAG \text{ no tempo zero} = 100 - \%AGL - \%DAG \quad (\text{Eq. 5})$$

Para os restantes tempos bastou estabelecer uma relação entre tempo zero e o tempo em estudo, seguindo o seguinte cálculo:

$$\%TAG = \frac{\% \text{área TAG no tempo em determinação} \times \% \text{massa TAG no tempo zero}}{\% \text{área TAG no tempo zero}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Por últimos, os ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) foram calculados através da equação seguinte:

$$\%EMAG = 100\% - \%TAG - \%AGL - \%DAG \quad (\text{Eq.7})$$

Através da aplicação destes cálculos aos resultados obtidos, foi possível monitorizar a reacção de transesterificação de óleo de cardo bruto com metanol, catalisada enzimaticamente, num meio reaccional bifásico orgânico/aquoso.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da acidez do óleo de cardo

Determinou-se a acidez para o óleo de cardo proveniente de sementes colhidas em 2007, a qual foi de 4,5% e para o óleo de 2009, que foi de 1,6%. A diferença de resultados era esperada, na medida em que se estava na presença de dois óleos provenientes de sementes antigas o que resulta na degradação do óleo e consequente produção de AGL, quer por hidrólise, quer por oxidação. Sengo *et al.* (2010) haviam já determinado que o óleo de cardo possuía uma acidez de 0,6% quando existia um curto espaço de tempo entre a colheita, extracção do óleo e análise. Esta informação, aliada aos dados recolhidos, indica que com o tempo o óleo de cardo vai-se deteriorando resultando num aumento da sua acidez.

Com a utilização destes óleos para produção de biodiesel pretendeu-se avaliar o efeito de diferentes teores de ácidos gordos livres na matéria-prima na reacção catalisada pela lipase/aciltransferase. Em princípio, as lipases são menos sensíveis à presença de AGL do que os catalisadores alcalinos (Ren *et al.*, 2011; Bajaj *et al.*, 2010). Contrariamente, se se estiver em presença de uma catálise básica, o óleo com 4,5% AGL necessitaria de ser neutralizado antes de utilizado no processo de transesterificação, o que representaria custos adicionais.

A percentagem em ácidos gordos livres passará a ser o factor de distinção dos óleos, ao longo deste trabalho.

4.2. Produção de biodiesel

A produção de biodiesel foi realizada a partir de óleo de cardo com 4,5% de AGL e 1,6% de AGL, por transesterificação com metanol catalisada pela enzima livre e imobilizada em Accurel MP1000 e Eupergit C.

Em primeiro lugar, é de salientar que o método utilizado para determinação da quantidade de ésteres metílicos (biodiesel) é pouco preciso e apresenta algumas limitações. O método de cromatografia em camada fina que prevê uma posterior medida das áreas num aparelho correspondentes a cada grupo de compostos. A medição destas áreas está sujeita a erros de delimitação e medição numa mesa digital.. Além disso, a área de cada banda não é equivalente em termos de quantidades para diferentes grupos de compostos. Neste trabalho, por não se dispor de um método alternativo de análise, partiu-se do princípio que o coeficiente de proporcionalidade entre as áreas e as quantidades eram iguais para os diferentes

grupos de compostos, o que não é correcto. Seria aconselhado a utilização de outros métodos como a cromatografia gasosa que separa dos compostos através da deslocação dos mesmos numa coluna numa corrente de gás inerte (fase móvel) no final do qual são detectados e quantificados os compostos químicos electronicamente.

Contudo, os resultados obtidos formam os mais precisos possíveis, e permitem comparar ensaios, uma vez que se utilizou sempre a mesma metodologia analítica.

4.2.1. Produção com enzima livre

A produção de biodiesel (ésteres metílicos de ácidos gordos) catalisada por enzima livre foi realizada em diferentes ensaios fazendo-se variar a concentração de lipase/aciltransferase utilizada nos ensaios com ambos os óleos (Anexo II).

Todavia, o primeiro ensaio foi realizado somente com o óleo com 4,5% AGL durante 6 horas, de forma a testar as condições reaccionais. Neste ensaio, foram utilizados dois reactores fazendo-se variar a quantidade de enzima: um reactor possuía 0,13% (m/m) de enzima e o outro 0,28% (m/m) de enzima. Os resultados obtidos são apresentados nas figuras 19 e 20 demonstrando a forma como os compostos variam ao longo do tempo nestas condições e, em particular, a concentração de ésteres metílicos de ácidos gordos presentes no fim da reacção.

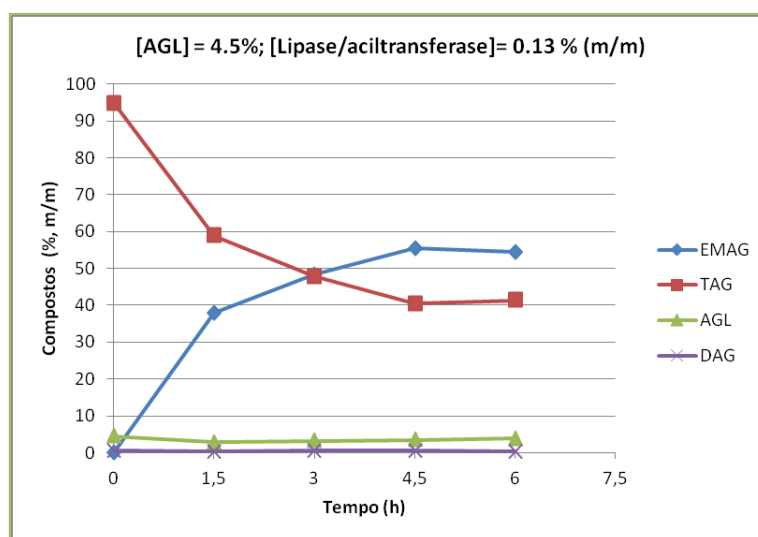


Fig.19 – Produção de biodiesel catalisada por enzima livre ao longo 6 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 0,13% (m/m))

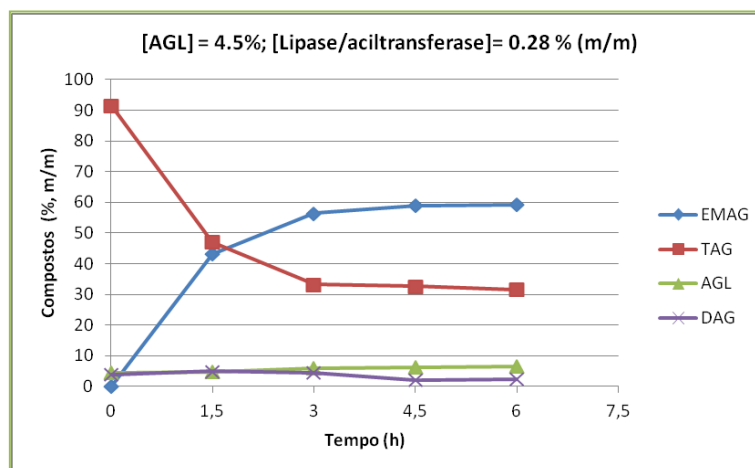


Fig.20- Produção de biodiesel catalisada por enzima livre ao longo 6 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 0,28% (m/m))

Através da análise dos resultados, verifica-se que (i) a enzima é capaz de catalisar a transesterificação de óleo de cardo com metanol, em meio bifásico orgânico/aquoso e que (ii) os valores de ácidos gordos livres (AGL) não variam muito com o tempo.

A produção de ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG), numa reacção de transesterificação, resulta do consumo dos triacilgliceróis (TAG) e diacilgliceróis (DAG), motivo pelo qual se verificou uma diminuição destes compostos no meio reaccional, ao longo do tempo, à medida que a concentração de EMAG aumentava. A evolução de TAG ocorre praticamente no sentido inverso dos EMAG pois este é um processo consecutivo.

Comparando os resultados dos dois ensaios, verificou-se que quanto maior a quantidade de enzima mais rápida a formação de ésteres metílicos de ácidos gordos. A concentração de EMAG ao fim de 6 horas de reacção, embora se verifique ligeiramente superior quando a concentração de lipase/aciltransferase é maior, pode ser situada entre os 55% e os 60% para ambos os ensaios. Após este tempo de reacção, a reacção já atingiu uma situação de quasi-equilíbrio.

Seguidamente, realizaram-se outros ensaios variando, novamente, a concentração de enzima no meio reaccional, mas agora em simultâneo para os óleos (1,6% e 4,5% AGL) e o tempo de reacção foi também aumentado para 24 horas. Desta forma, para o óleo com 4,5% de AGL preparou-se um ensaio com 0,13% de enzima e outros dois com 0,28% de enzima, tendo-se obtido os resultados apresentados nas figuras 21 e 22.

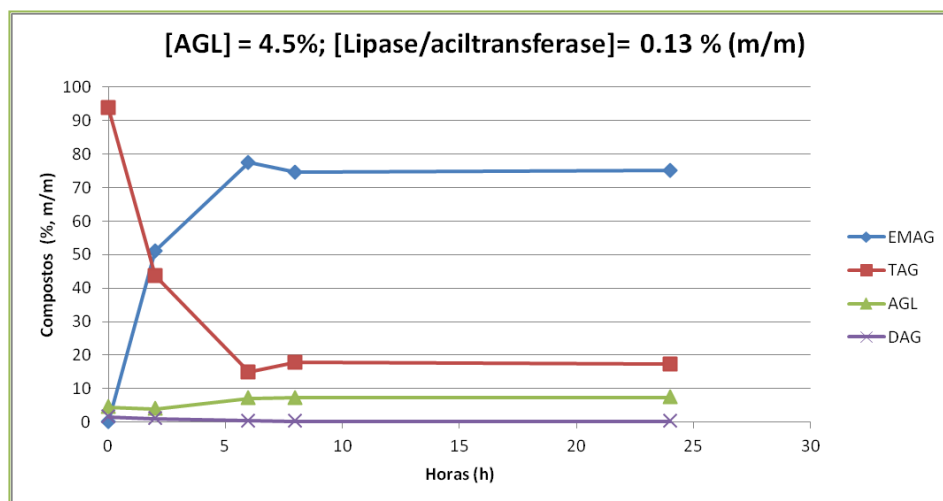


Fig.21 – Produção de biodiesel catalisada por enzima livre ao longo 24 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 0,13% (m/m))

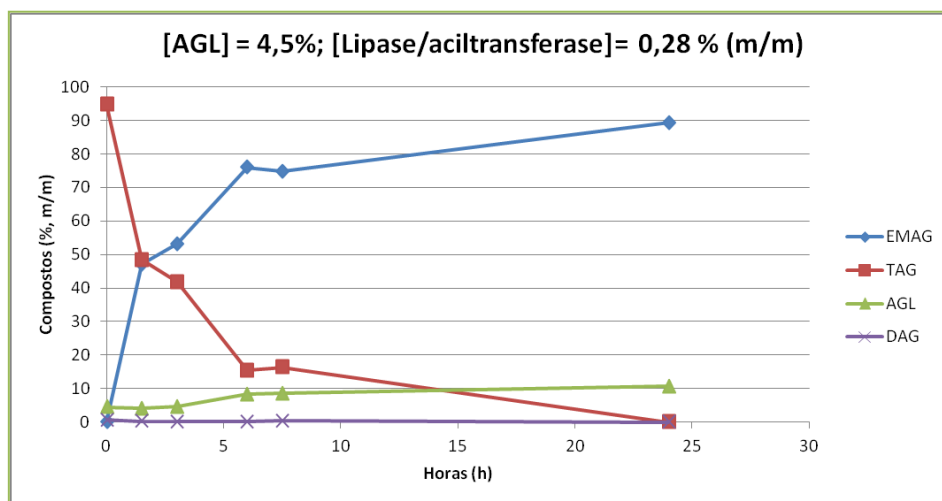


Fig.22 – Produção de biodiesel catalisada por enzima livre ao longo 24 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 0,28% (m/m))

Usam-se as mesmas condições para produção de biodiesel a partir de óleo com 1,6% de AGL, n um ensaio com cerca de 0,28% enzima em óleo (fig.23).

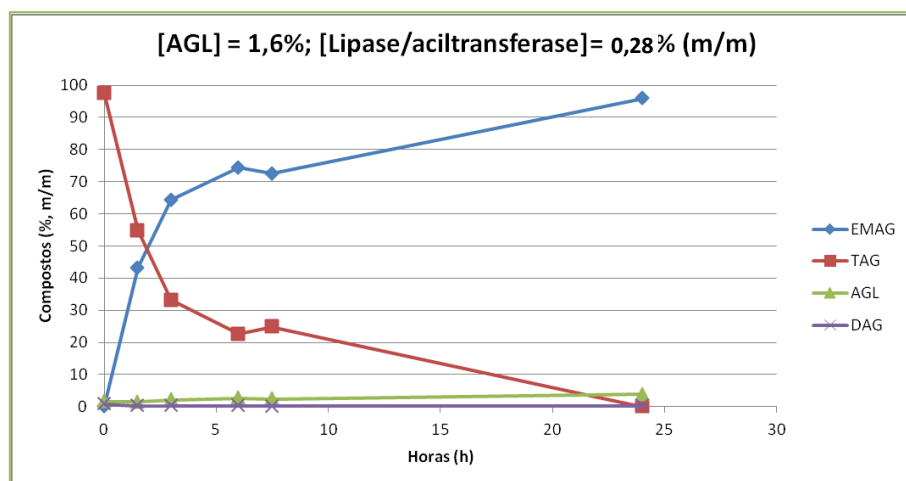


Fig.23 - Produção de biodiesel catalisada por enzima livre ao longo 24 horas de reacção ([AGL]=1,6% e [lipase/aciltransferase] = 0,28% (m/m))

De um modo geral e em primeiro lugar, constatou-se que ao realizar ensaios durante um período de tempo mais longo (6h para 24h) é possível alcançar uma maior produção de ésteres metílicos de ácidos gordos, apesar de às 6h de reacção já se estar próximo do equilíbrio.

Por outro lado, o rendimento quando analisado ao nível da concentração de catalisador, constatou-se que a produção de biodiesel é maior quando aplicadas maiores quantidades de enzima.

No ensaio para o óleo com 4,5% e menor concentração de enzima (fig. 21), verificou-se que das 8 h às 24 h ocorreu uma estabilização do rendimento em EMAG numa média de 75% de ésteres metílicos de ácidos gordos produzido. Para este mesmo óleo, mas para uma concentração de 0,28% de lipase/aciltransferase no meio reaccional, verificou-se que é possível alcançar cerca de 90% de ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) ao fim das 24 horas.

Nos ensaios com o óleo com 1,6% de ácidos gordos livres, e uma concentração enzimática de cerca de 0,28% no meio (fig.23), o rendimento obtido chegou a um patamar bastante elevado de ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG), tendo-se mesmo obtido uma produção de biodiesel de 97% num dos casos. Este é um resultado bastante positivo no estudo na medida em que, sob as condições em que foi realizado, o rendimento ultrapassou o mínimo de ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) estipulado na Norma Europeia EN-14214 (2009) para biodiesel depois de purificado. A Norma Europeia obriga a uma presença no mínimo de 96,5% de ésteres metílicos de ácidos gordos no biodiesel produzido a partir de óleo de sementes de cardo. Esta norma indica, também, que os diacilgliceróis e os triacilgliceróis não deveriam estar presentes em mais de 0,2% no biodiesel, algo que não está em conformidade com os resultados obtidos mesmo quando o valor de ésteres metílicos é o indicado, contudo este biodiesel ainda não foi purificado.

De um modo geral, verifica-se que, tanto para o óleo de cardo com 4,5% e 1,6% de ácidos gordos livres, ocorre uma produção de biodiesel (EMAG) semelhante à obtida por catálise química quando é aplicada uma maior concentração de enzima livre.

4.2.2. Produção de biodiesel com enzima imobilizada

Uma vez obtido resultados positivos na produção de biodiesel a partir de óleo de cardo catalisada pela lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* na forma livre, no meio bifásico orgânico/aquoso, passou-se para a realização de ensaios com recurso a enzima imobilizada. Estes ensaios passaram a ter uma duração de 48h e foram utilizados como suporte para imobilizar a enzima as resinas Accurel MP1000 (Anexo III) e a Eupergit C (Anexo IV).

Os primeiros 4 ensaios foram realizados com 6,5 mg de enzima imobilizada em Accurel MP1000, o que resultou numa concentração de 0,14% no meio reaccional. Estes ensaios foram realizados com os dois óleos de cardo em estudo. Em ambos os casos, verificou-se que o teor de TAG no meio reaccional era próximo de zero, após 6h de reacção, enquanto a área dos EMAG era detectada na maioria dos ensaios, após o tempo de reacção. Contudo, para tempos superiores, desapareciam as bandas de EMAG e dos restantes compostos (Anexo III a)). Uma vez que se pensou ser um problema relacionado com os pequenos volumes de tomas, optou-se por realizar dois ensaios em reactores de maior capacidade volumetria, aumentando proporcionalmente o meio reaccional. Aumentou-se ainda a concentração de enzima imobilizada em Accurel MP1000 que passou a ser de 2,65% no novo meio reaccional. Os resultados com estes ensaios estão apresentados na fig. 24, para o óleo com 4,5% de AGL, e fig.25, para o óleo com 1,6% de AGL.

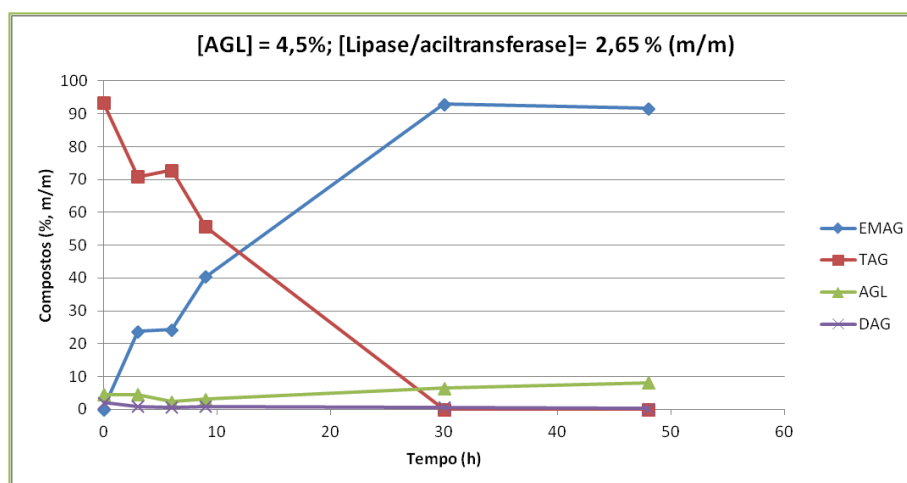


Fig.24 – Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Accurel MP1000 ao longo 48 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 2,65% (m/m))

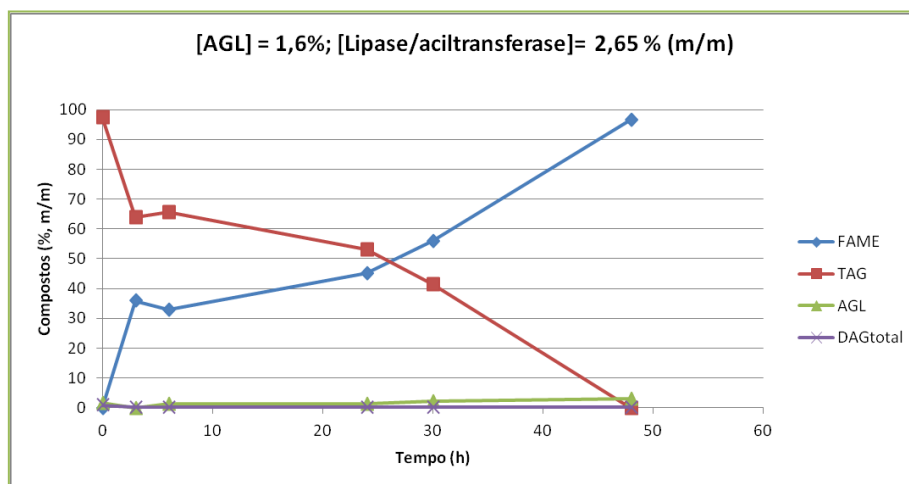


Fig.25 – Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Accurel MP1000 ao longo 48 horas de reacção ([AGL]=1,6% e [lipase/aciltransferase] = 2,65% (m/m))

Nestas condições, verificou-se uma tendência para a formação de ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) mais lenta quando comparada com a utilização de enzima livre. A utilização de reactores de maiores dimensões serviam para diminuir o risco de erros de amostragem pois existe mais óleo no meio e a mesma quantidade é recolhida. Contudo, constatou-se que do tempo zero para a primeira amostra (3h) ocorreu uma diminuição da área em mais de metade, o que significa que a quantidade total de compostos no meio reaccional diminuiu. Verificou-se inclusive o desaparecimento total de triacilgliceróis (TAG) nas 48h no ensaio com óleo de 1,6% de AGL e a partir das 6h com o óleo de 4,5% de AGL, originando concentrações estimadas demasiado elevadas de ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG). Estes resultados obtidos não são credíveis, na medida em que a imobilização das enzimas resulta em perdas de actividade catalítica, o que significa uma menor produção de biodiesel quando comparada com a produção catalisada por enzima livre.

O motivo apontado para os resultados obtidos com enzima imobilizada Accurel MP1000 passa pela possível adsorção do óleo (TAG) por parte do suporte hidrofóbico, o que leva à diminuição total das áreas, do tempo zero para os restantes, e à ausência de TAG no meio reaccional ao fim de algum tempo de reacção. Esta explicação foi comprovada através da realização de um ensaio nas mesmas condições, mas adicionando-se ao meio reaccional o suporte sem enzima imobilizada (Anexo V), demonstram oscilações e desaparecimento de todos os compostos do meio (EMAG, TAG, AGL e DAG), comprovando a adsorção destes por parte do suporte.

Por este motivo, alterou-se a estratégia de recolha de amostras em ensaios utilizando enzima imobilizada em Accurel MP1000. Desta forma, em vez de se

recolherem amostras ao longo do tempo num determinado ensaio, realizaram-se ensaios com a duração de 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 30h, 48h de modo a recolher a totalidade do meio reaccional. Deste modo, as amostras são verdadeiramente representativas, evitando-se erros de amostragem. Contudo, em ambos os casos verificou-se uma nova adsorção dos triacilgliceróis a partir das 9h de reacção o que implicou um reajuste no método de cálculo de concentração de ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG), através de uma relação com os resultados verificados com enzima livre. Como referido na bibliografia, a enzima imobilizada não pode apresentar um poder catalítico superior à enzima livre, uma vez que existem moléculas de enzima que ficam inactivadas durante o processo de imobilização e porque há limitações difusionais. Estes ensaios foram realizados em duplicado para que, além do recolha de amostras para cromatografia fina, fosse calculada a acidez do óleo no meio reaccional ao longo do tempo, de modo a determinar de forma directa a percentagem de ácidos gordos livres presentes. Os dados obtidos nos diferentes ensaios permitiram obter os resultados representados nas figuras 26 e 27, quando o óleo utilizado continha uma acidez inicial de 4,5% e de 1,6%, respectivamente.

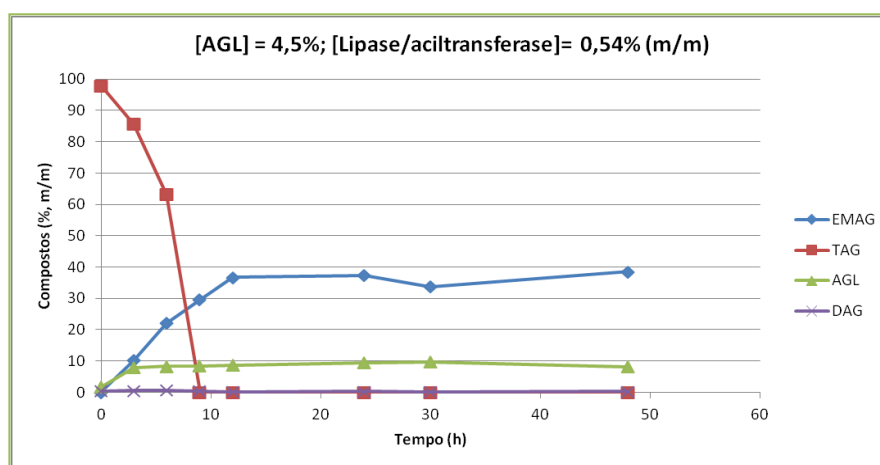


Fig.26 - Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Accurel MP1000 ao longo 48 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 0,54% (m/m))

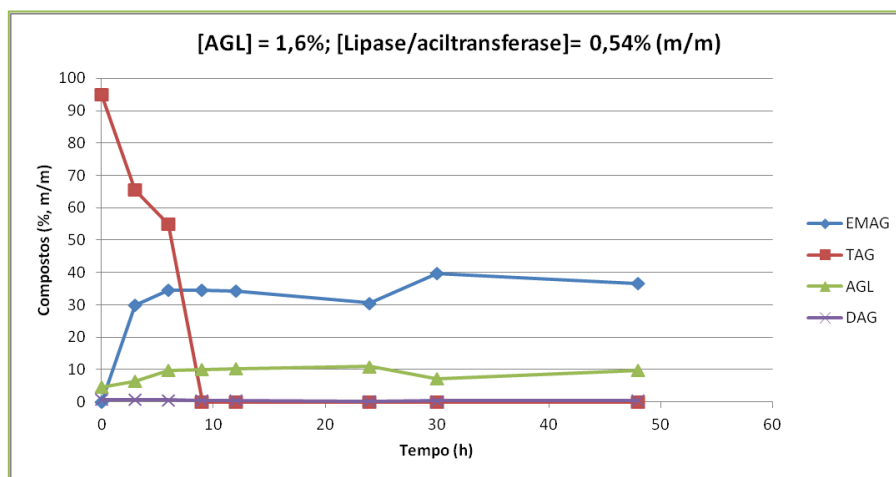


Fig.27 - Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Accurel MP1000 ao longo 48 horas de reação ([AGL]=1,6% e [lipase/aciltransferase] = 0,54% (m/m))

Os resultados obtidos demonstram de facto que os triacilgliceróis (TAG) deixam de ser quantificados no meio reaccional devido à adsorção deste por parte do suporte, no seu microambiente onde está imobilizada a enzima, ou seja, o substrato fica aprisionado no interior da matriz da imobilização. Contudo, com a adaptação dos cálculos foi possível determinar o rendimento de ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG), que demonstram uma produção de biodiesel entre os 30% e os 40% quando o processo de transesterificação é catalisado por lipase/aciltransferase imobilizada em Accurel MP1000 (Anexo III de e) a f)). Novamente é verificada que esta produção é independente do nível de ácidos gordos livres presentes na matéria-prima como mencionado na bibliografia.

Para além dos ensaios com enzima imobilizada em Accurel MP1000, foi realizado um ensaio com enzima imobilizada em Eupergit C, para cada óleo. Os resultados obtidos (fig. 28 e 29) mostraram que com este biocatalisador se alcançaram rendimentos de 45% a 50% de ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) no processo. Todavia, é de notar que ainda ficou no meio reaccional bastante quantidade de triacilgliceróis (TAG) que poderiam originar resultados ainda melhores se tivessem sido transformados. O estudo de lipase/aciltransferase imobilizada em Eupergit C ficou limitada a estes dois ensaios, devido a escassez de tempo e de suporte de imobilização. Contudo, fica a ideia que este poderá ser um estudo interessante de se fazer, nomeadamente variando a concentração enzimática no meio reaccional e comparando os dados com os resultados obtidos com imobilização da enzima em Accurel MP1000.

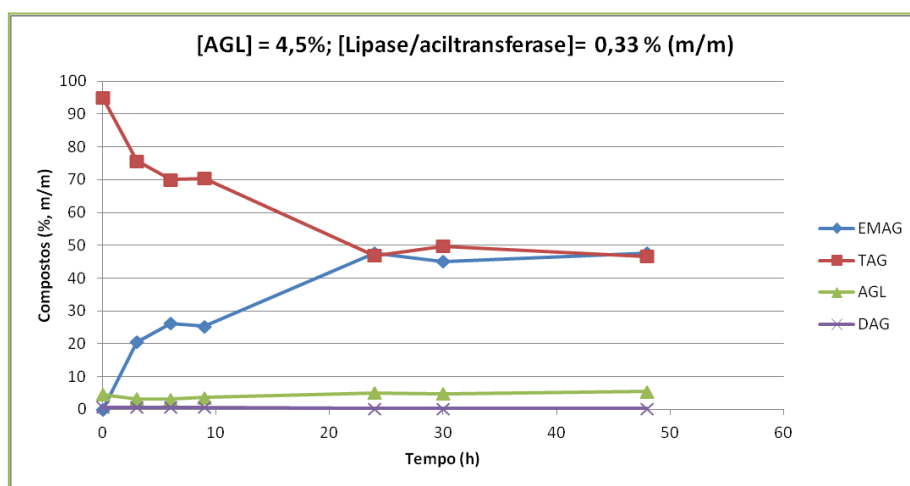


Fig.28 – Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Eupergit C ao longo 48 horas de reacção ([AGL]=4,5% e [lipase/aciltransferase] = 0,33% (m/m))

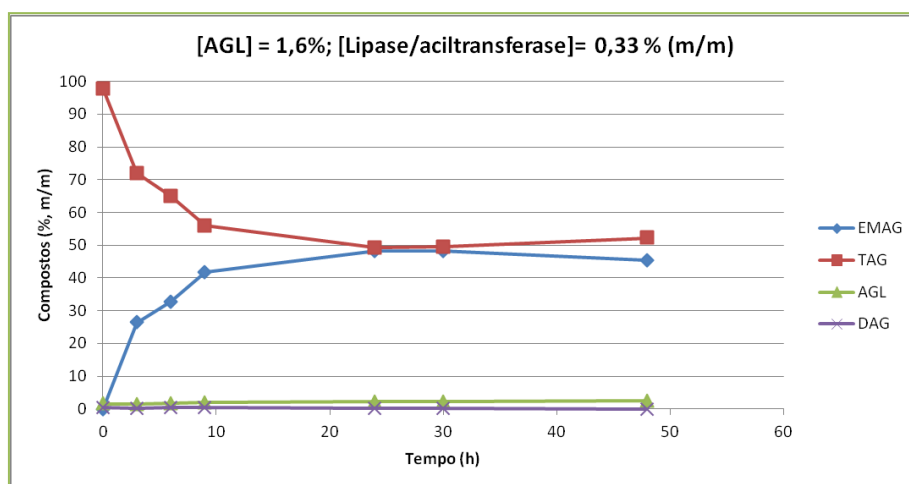


Fig.29 - Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Eupergit C ao longo 48 horas de reacção ([AGL]=1,6% e [lipase/aciltransferase] = 0,33% (m/m))

5. CONCLUSÕES

Da realização deste trabalho, podem retirar-se as seguintes conclusões:

- O óleo extraído de sementes colhidas em 2007 e 2009 possuía uma percentagem de ácidos gordos livres de 4,5% e 1,6%, respectivamente.
- Embora apresentando diferente grau de acidez, os óleos comportaram-se de modo semelhante na produção de ésteres metílicos de ácidos gordos, na presença de enzima livre ou imobilizada, em função das condições em que foram realizados os diferentes ensaios.
- Comprovou-se que a produção de biodiesel por catálise enzimática não é influenciada por uma elevada concentração de ácidos gordos livres na matéria-prima.
- É possível a produção de biodiesel por catálise enzimática (lipase/aciltransferase) a partir de óleo de cardo num meio bifásico orgânico/aquoso. Os maiores rendimentos em ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) foram obtidos quando a enzima se encontrava na forma livre, numa concentração de 0,28% (m/m), alcançando-se um rendimento de cerca de 90%.
- Quando a enzima utilizada foi imobilizada, em Accurel MP1000 e Eupergit C, o rendimento de ésteres metílicos (EMAG) diminuiu, comparativamente com a enzima livre. Quando o suporte aplicado foi accurel, o rendimento aproxima-se dos 40%.
- A cromatografia em camada fina revelou ser uma técnica pouco adequada à quantificação dos produtos de reacção. Sugere-se que num novo estudo se recorra à análise de amostras por cromatografia gasosa. Em estudos futuros deverão ser optimizadas as condições reaccionais.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adamczak M., Bornscheuer U. T., Bednarski W. (2009). The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel - Review Article. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, **111**, 800–813.
- Al-Zuhair S. (2007). Production of biodiesel: possibilities and challenges – Review. *Biofuels, Bioprod and Bioref*, **1**, 57–66.
- Bajaj A., Lohan P., Jha P. N., Mehrotra R. (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **62**, 9–14.
- Bassan, N., et al. (1996). Renewable Energy - Potencial energy crops for Europe and the Mediterranean region. REU Technical Series 46. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*. Rome.
- BIODIESEL 2020: Global Market Survey, Feedstock Trends and Forecasts (2008). Multi-Client Study, 2nd Edition. Emerging Markets Online. <http://www.emerging-markets.com/biodiesel/default.asp>.
- Carmona P., Correia N. (2009). Biodiesel: Tecnologia do Biodiesel. *Energias Renováveis* (pp.170-177). Atelier Nunes e Pã. Porto, Portugal.
- Castro A. (2003). Ciência e tecnologia: *A Química e a Reologia no Processamento dos Alimentos* (pp.143-163); tipografia tadinense. Instituto Piaget. Portugal.
- DGEG: Direcção Geral de Energia e Geologia. Ministério da Agricultura e do Trabalho. www.dgeg.pt.
- Directiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 8 de Maio de 2003, relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes. Jornal Oficial da União Europeia, L123/42-46.
- Directiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril de 2009, relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis que altera e subsequentemente revoga as Directivas 2001/77/CE

e 2003/30/CE (Texto relevante para efeitos do EEE). Jornal Oficial da União Europeia, L 140/16-62.

- EBB: European Biodiesel Board (2011). <http://www.ebb-eu.org/index.php>. Bruxelas, Belgica.
- Encinar J. M., González J. F., Sabio E., Ramiro M. J. (1999). Preparation and Properties of Biodiesel from *Cynara cardunculus* L. *Oil. Ind. Eng. Chem. Res.*, **38** (8), 2927–2931.
- Fernández J., Curt M. D., low-cost biodiesel from *Cynara* oil (2004); 2ª Conferencia e Exposição Mundial de Biomassa e Energia, Industria e Protecção Climateria. Roma, Itália.
- Filho A. V. L., Raulino N. M., Cesar A. C. B., Rodrigues R. J. P. (2003); O Biodiesel e a Inclusão Social; Câmara dos Deputados Conselho de Altos Estudos e Avaliação Tecnológica. Centro de Documentação e Informação Coordenação de Publicações. Brasília, Brasil.
- Gominho J., Pereira H. (1995). O cardo: uma matéria-prima para pasta para papel. *Actas do III congresso florestal nacional: os recursos florestais no desenvolvimento rural*, vol.2 (pp.427-440). Lisboa: Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais.
- Lima P. C. R. (2004). *O Biodiesel e a Inclusão Social*. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados. Centro de Documentação e Informação, Brasília, Brasil.
- Macedo, G. A., Macedo J. A. (2004). Produção de Biodiesel por Transesterificação de Óleos Vegetais, Biodiesel. *Biotecnologia Ciencia & Desenvolvimento* nº32 (pp.30-46), Brasil.
- Majer S., Mueller-Langer F., Zeller V., Kaltschmitt M. (2009). Implications of biodiesel production and utilization on global climate – a literature review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **111**, 747–762.
- Meher L.C., Sagar D.V., Naik S.N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review; *Rewable and Sustainable Energy Reviews*, **10**, 248-268.

- Modi M. K., Reddy J.R.C., Rao B.V.S.K., Prasad R.B.N. (2007). Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresource Technology*, **98**, 1260–1264.
- Neugnot V., Moulin G., Dubreucq E., Bigey F. (2002). The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: Molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes; *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1734-1745.
- Norma Portuguesa (2009). Combustíveis para automóveis, Ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) para motores a gasóleo, Especificações e métodos de ensaio.
- Norma Portuguesa NP-14214 (2009); Combustíveis para automóveis, Ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) para motores a gasóleo, Especificações e métodos de ensaio.
- Norma Portuguesa NP-1761 (1984). Gorduras e óleos comestíveis. Determinação do teor de ácidos gordos em posição 2 nos triglicéridos (pp. 5 de 14).
- Norma Portuguesa NP-903 (1972) para Gorduras e Óleos Comestíveis.
- Porfírio J.A. (2006). A Estratégia Nacional para os biocombustíveis e as culturas energéticas (A visão do MADRP). Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (Assessor do Gabinete do Ministro). Lisboa, Portugal.
- Quilhó, T., Gominho, J., Pereira H. (2004). Anatomical characterisation and variability of the thistle *Cynara cardunculus* L. in view of pulping potential. *IAWA Journal*, **25(2)**, 217-230.
- Ren H, Du W., Lv L., Liu D. (2011). Study on Free Lipase-Catalyzed Ethanolysis for Biodiesel Preparation in an Oil/Water Biphasic System. *J Am Oil Chem Soc.*, **88**, 1551–1555.
- Robles-Medina A., González-Moreno P.A., Esteban-Cerdán L., Molina-Grima E. (2009) Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, **27**, 398-408.
- Rosa M. F. (2006). Situação Actual dos Biocombustíveis e Perspectivas Futuras. INETI - Departamento de Energias Renováveis. *Gazeta de Física* (pp. 46-47). Portugal.

- Sarmiento B. M. (2006). Biocombustíveis: Enquadramento Legal. *Quercus-Ambiurbe*. Lisboa, Portugal.
- Schuchardt U, Sercheli R., Vargas R. M. (1998). Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *J. Braz. Chem. Soc.*, **9**, 199-210.
- Sengo I., Gominho J., d'Orey L., Martins M., d'Almeida-Duarte E., Pereira H., Ferreira-Dias S. (2010). Response surface modeling and optimization of biodiesel production from *Cynara cardunculus* oil. *Eur J Lipid Sci Technol*, **112**, 310–320.
- Tyson K. S. (2003). Biodiesel Technology and Feedstocks. National Renewable Energy Laboratory. *Biodiesel for New England Eastern Connecticut State Univ*.
- Verdugo C., Luque R., Luna D., Hidalgo J.M., Posadillo A., Sancho E. D., Rodriguez S., Ferreira-Dias S., Bautista F., Romero A. A. (2010). A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of novel biofuels integrating glycerol into their composition. *Bioresource Technology*, **101**, 6657–6662.
- Villeneuvea P., Muderhwab J. M., Graillea J., Haasc M.J. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Volume 9, Issues 4-6.
- Weil J.H. (2000). *Bioquímica Geral* (pp.85-247). 2ªEdição. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.

7. ANEXOS

ANEXO I

Determinação das quantidades de meio reaccional e sua constituição

- Capacidade dos reactores

A capacidade dos reactores é determinada pelo volume, sabendo que estes possuem uma altura de 2,5cm e diâmetro de 3cm. Com o cálculo do volume de um cilindro ($v = \frac{\pi D^2}{4} h$) chega-se à conclusão que a capacidade máxima é de 17cm³. Como não se trabalha com a totalidade do reactor afirma-se que a capacidade é, de facto, 15cm³.

- Óleo e Solução tampão

Para uma capacidade de 15cm³, determina-se que 10mL são para óleo e tampão pois a sua proporção é de 1:4, ou seja, 2mL de óleo com 8mL de solução tampão.

- Metanol

Sabendo que será trabalhado com Metanol , 2M determinam-se o nº de moles em 10mL:

2moles ---- 1000mL

X ---- 10mL $x = 2 \times 10^{-2}$ moles MeOH

Sabendo que a massa molar de MeOH é 32g/mol chega-se ao nº de gramas e com o valor de densidade de 0,7918, por sua vez, conclui-se a quantidade volúmica, que se tem de acrescentar no reactor, de metanol é de 0,8mL:

32 g ---- 1 mol

y ---- 2×10^{-2} moles MeOH $y = 0,64$ g MeOH

1 cm³ ---- 0,7918 g

z ---- 0,64 g MeOH $z = 0,80$ mL MeOH

- Enzima

200mg Enzima / L meio reaccional

200mg ---- 1000mL

x ---- 10 mL $x = 2$ mg

Anexo II

Produção de biodiesel catalisada por enzima livres

a) [AGL] = 4,5%; [Lipase/aciltransferase] = 0,13 % (m/m)

Tempo (h)	EMAG			TAG			AGL			DAGs	DAGi	DAGtotal			Total área
	Área	% Área	% massa	Área	% Área	% massa	Área	% Área	% massa	Área	Área	Área	% Área	% massa	
0	0	0,00	0,00	14,08	58,96	94,83	7,79	32,62	4,50	0,98	1,03	2,01	8,42	0,67	23,88
1,5	5,05	34,68	37,93	5,33	36,61	58,88	2,94	20,19	2,79	0,73	0,51	1,24	8,52	0,41	14,56
3	6,07	35,56	48,27	5,08	29,76	47,87	4	23,43	3,23	1,04	0,88	1,92	11,25	0,64	17,07
4,5	6,49	38,29	55,45	4,26	25,13	40,42	4,29	25,31	3,49	1,3	0,61	1,91	11,27	0,63	16,95
6	6,08	38,65	54,43	4,04	25,68	41,31	4,4	27,97	3,86	0,64	0,57	1,21	7,69	0,40	15,73

b) [AGL] = 4,5%; [Lipase/aciltransferase] = 0,28 % (m/m)

Tempo (h)	EMAG			TAG			AGL			DAGs	DAGi	DAGtotal			Total área
	Área	% Área	% massa	Área	% Área	% massa	Área	% Área	% massa	Área	Área	Área	% Área	% massa	
0	0	0,00	0,00	12,36	60,80	91,61	5,58	27,45	4,50	1,55	0,84	2,39	11,76	3,89	20,33
1,5	3,57	24,37	43,13	4,58	31,26	47,11	4,31	29,42	4,82	0,96	1,23	2,19	14,95	4,95	14,65
3	3,68	28,42	56,46	2,85	22,01	33,16	4,67	36,06	5,91	0,9	0,85	1,75	13,51	4,47	12,95
4,5	4,2	33,84	58,97	2,69	21,68	32,66	4,72	38,03	6,24	0,8	0	0,8	6,45	2,13	12,41
6	3,47	31,23	59,33	2,33	20,97	31,60	4,49	40,41	6,63	0,82	0	0,82	7,38	2,44	11,11

c) [AGL] = 4,5%; [Lipase/aciltransferase] = 0,13 % (m/m)

Tempo (h)	EMAG			TAG			AGL			DAGtotal			DAGs	DAGi	Soma das áreas
	Área	% Área	% Massa	Área	% Área	% Massa	Área	% Área	% Massa	Área	% Área	% Massa	Área	Área	
0	0	0,00	0,00	30,61	63,94	93,87	12,33	25,76	4,50	4,93	10,30	1,63	3,17	1,76	47,87
2	8,15	33,58	51,15	7,3	30,08	43,77	5,56	22,91	4,00	3,26	13,43	1,08	1,46	1,8	24,27
6	5,3	40,61	77,58	1,34	10,27	14,94	5,32	40,77	7,12	1,09	8,35	0,36	1,09	0	13,05
8	5,71	39,38	74,57	1,77	12,21	17,76	6,12	42,21	7,37	0,9	6,21	0,30	0,9	0	14,5
24	5,09	39,27	75,01	1,54	11,88	17,29	5,51	42,52	7,43	0,82	6,33	0,27	0,82	0	12,96

d) [AGL] = 4,5%; [Lipase/aciltransferase] = 0,28 % (m/m)

Tempo (h)	FAME			TAG			AGL			DAGtotal			DAGs	DAGi	Soma das áreas
	Área	% Área	% Massa	Área	% Área	% Massa	Área	% Área	% Massa	Área	% Área	% Massa	Área	Área	
0	0	0,00	0,00	27,39	58,65	93,48	13,20	28,27	4,50	6,11	13,08	2,02	4,47	1,64	46,70
2	8,01	34,29	44,22	7,54	32,28	51,45	5,00	21,40	3,41	2,81	12,03	0,93	1,38	1,43	23,36
4	7,22	38,53	66,11	3,35	17,88	28,49	5,20	27,75	4,42	2,97	15,85	0,98	1,57	1,40	18,74
6	6,15	47,38	65,65	2,35	18,10	28,86	4,48	34,51	5,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,98
8	5,61	44,52	68,58	2,05	16,27	25,93	4,13	32,78	5,22	0,81	6,43	0,27	0,81	0,00	12,6
24	6,14	45,01	65,58	2,50	18,33	29,21	4,25	31,16	4,96	0,75	5,50	0,25	0,75	0,00	13,64

e) [AGL] = 4,5%; [Lipase/aciltransferase] = 0,28 % (m/m)

Tempo (h)	EMAG			TAG			AGL			DAGtotal			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	
0	0	0,00	0,00	13,6397	67,54	94,81	4,4548	22,06	4,50	2,10186	10,41	0,70	20,19636
1,5	4,04059	38,96	47,17	3,47969	33,56	48,54	2,04544	19,72	4,02	0,804247	7,76	0,27	10,369967
3	3,78189	40,56	53,26	2,69648	28,92	41,84	2,1337	22,89	4,67	0,711296	7,63	0,24	9,323366
6	3,09307	40,71	76,03	0,810711	10,67	15,43	3,10907	40,92	8,35	0,585873	7,71	0,19	7,598724
7,5	3,42467	37,34	74,82	1,0379	11,32	16,37	3,82749	41,73	8,51	0,881079	9,61	0,29	9,171139
24	2,67894	47,83	89,36	0	0,00	0,00	2,92155	52,17	10,64	0	0,00	0,00	5,60049

f) [AGL] = 1,6%; [Lipase/aciltransferase] = 0,13 % (m/m)

Tempo (h)	EMAG			TAG			AGL			DAGtotal			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	
0	0	0,00	0,00	16,94	65,53	97,63	6,58	25,45	1,60	2,33	9,01	0,77	25,85
1,5	2,13	21,24	25,37	4,95	49,35	73,53	1,77	17,65	1,10	1,18	0,00	0,00	10,03
3	3,03	27,82	40,50	4,22	38,75	57,73	2,34	21,49	1,34	1,3	11,94	0,43	10,89
4,5	2,84	26,87	45,30	3,74	35,38	52,72	2,59	24,50	1,53	1,4	13,25	0,46	10,57
6	2,89	27,21	49,96	3,4	32,02	47,70	3,55	33,43	2,08	0,78	7,34	0,26	10,62
7,5	3,05	27,80	48,40	3,63	33,09	49,30	3,72	33,91	2,11	0,57	5,20	0,19	10,97
24	2,5	27,41	54,66	2,62	28,73	42,80	3,47	38,05	2,37	0,53	5,81	0,18	9,12

g) [AGL] = 1,6%; [Lipase/aciltransferase] = 0,27 % (m/m)

Tempo (h)	EMAG			TAG			AGL			DAGtotal			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	
0	0	0,00	0,00	11,855	69,31	97,89	3,7	21,63	1,60	1,55	9,06	0,51	17,105
1,5	2,52	27,24	39,66	3,82	41,30	58,33	2,24	24,22	1,79	0,67	7,24	0,22	9,25
3	3,1	33,19	58,53	2,57	27,52	38,86	3,03	32,44	2,40	0,64	6,85	0,21	9,34
6	2,46	49,10	97,01	0	0,00	0,00	1,87	37,33	2,76	0,68	13,57	0,23	5,01
7,5	4,29	55,64	97,14	0	0,00	0,00	2,75	35,67	2,64	0,67	8,69	0,22	7,71
24	2,29	44,21	96,20	0	0,00	0,00	2,59	50,00	3,70	0,3	5,79	0,10	5,18

h) [AGL] = 1,6%; [Lipase/aciltransferase] = 0,28 % (m/m)

Tempo (h)	FAME			TAG			AGL			DAGtotal			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	
0	0	0,00	0,00	13,43595	72,25	97,60	2,73113	14,69	1,60	2,428996	13,06	0,80	18,596076
1,5	4,21834	36,60	43,26	4,68279	40,63	54,88	1,6088	13,96	1,52	1,016198	8,82	0,34	11,526128
3	4,50123	46,19	64,34	2,39354	24,56	33,18	1,95903	20,10	2,19	0,891928	9,15	0,30	9,745728
4,5	4,03328	46,42	74,41	1,45314	16,72	22,59	2,10115	24,18	2,63	1,102021	12,68	0,36	8,689591
7,5	4,57418	52,42	72,55	1,60526	18,39	24,85	1,9162	21,96	2,39	0,631117	7,23	0,21	8,726757
24	3,82722	53,68	95,90	0	0,00	0,00	2,51535	35,28	3,84	0,787589	11,05	0,26	7,130159

Anexo III

Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Accurel

a) [AGL] = 4,5%; [Lipase/aciltransferase] = 0,14 % (m/m)

Tempo (h)	FAME			TAG			AGL			DAGtotal			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	
0	0,000000	0,00	0,00	5,968740	73,80	92,43	1,367695	16,91	4,50	0,751005	9,29	3,07	8,1
3	1,094570	20,80	21,04	3,088590	58,68	73,50	1,079890	20,52	5,46	0,000000	0,00	0,00	5,3
6	0,916568	22,95	32,09	1,919420	48,06	60,20	1,157440	28,98	7,71	0,000000	0,00	0,00	4,0
9	0,431816	49,62	86,59	0,000000	0,00	0,00	0,438413	50,38	13,41	0,000000	0,00	0,00	0,9
24	0,000000	0,00	100,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,0
30	0,000000	0,00	100,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,0
48	0,000000	0,00	100,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,0

Tempo (h)	FAME			TAG			AGL			DAGtotal			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	
0	0,000000	0,00	0,00	12,15095	65,38	90,46	3,60535	19,40	4,50	2,82840	15,22	5,04	18,6
3	2,214350	16,30	16,97	7,373900	54,28	75,10	2,46980	18,18	4,22	1,52790	11,25	3,72	13,6
6	2,590500	22,92	27,45	5,284200	46,75	64,68	2,48430	21,98	5,10	0,94405	8,35	2,76	11,3
9	0,000000	0,00	100,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,0
24	0,000000	0,00	100,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,0
30	0,000000	0,00	100,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,0
48	0,000000	0,00	100,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,0

b) [AGL] = 1,6%; [Lipase/aciltransferase] = 0,14 % (m/m)

Tempo (h)	FAME			TAG			AGL			DAGtotal			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	
0	0,000000	0,00		11,15600	72,34		2,62742	17,04		1,63905	10,63		15,42247
3	0,000000	0,00		3,21714	100,00		0,000000	0,00		0,000000	0,00		3,21714
6	2,51016	33,60		3,47869	46,57		1,48115	19,83		0,000000	0,00		7,47000
9	1,96780	38,49		1,71907	33,63		1,42559	27,88		0,000000	0,00		5,11246
12	3,38800	69,15		0,000000	0,00		1,51139	30,85		0,000000	0,00		4,89939
24	2,39597	62,45		0,000000	0,00		1,44067	37,55		0,000000	0,00		3,83664
30	2,32949	72,29		0,000000	0,00		0,89278	27,71		0,000000	0,00		3,22227
48	3,51493	66,78		0,000000	0,00		1,74842	33,22		0,000000	0,00		5,26335

Tempo (h)	FAME			TAG			AGL			DAGtotal			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	
0	0,000000	0,00		12,15095	75,15		2,51788	15,57		1,49935	9,27		16,2
3	0,000000	0,00		3,80675	100,00		0,000000	0,00		0,0	0,00		3,8
6	4,03060	28,78		6,05000	43,20		2,14850	15,34		1,77635	12,68		14,0
9	0,000000	0,00		0,000000	0,00		0,000000	0,00		0,000000	0,00		0,0
24	0,000000	0,00		0,000000	0,00		0,000000	0,00		0,000000	0,00		0,0
30	0,000000	0,00		0,000000	0,00		0,000000	0,00		0,000000	0,00		0,0
48	0,000000	0,00		0,000000	0,00		0,000000	0,00		0,000000	0,00		0,0

c) [AGL] = 4,5%; [Lipase/aciltransferase] = 2,65 % (m/m)

Tempo (h)	EMAG			TAG			AGL			DAGtotal			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	
0	0,0000	0,00	0,00	30,0011	61,77	93,49	12,5080	25,75	4,50	6,0625	12,48	2,01	48,6
3	3,0514	15,11	23,77	9,4638	46,87	70,93	5,1606	25,56	4,47	2,5177	12,47	0,83	20,2
6	2,3777	21,29	24,32	5,3697	48,08	72,77	1,4394	12,89	2,25	1,9810	17,74	0,66	11,2
9	3,2624	25,71	40,38	4,6685	36,80	55,69	2,2508	17,74	3,10	2,5056	19,75	0,83	12,7
30	4,7912	45,35	92,98	0,0000	0,00	0,00	3,8641	36,58	6,39	1,9093	18,07	0,63	10,6
48	5,9828	47,64	91,66	0,0000	0,00	0,00	5,8105	46,26	8,09	0,7660	6,10	0,25	12,6

d) [AGL] = 1,6%; [Lipase/aciltransferase] = 2,65 % (m/m)

Tempo (h)	FAME			TAG			AGL			DAGtotal			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	
0	0,00000	0,00	0,00	23,94215	71,40	97,46	6,87375	20,50	1,64	2,71843	8,11	0,90	33,5
3	5,29760	46,79	35,89	5,29760	46,79	63,87	0,00000	0,00	0,00	0,72720	6,42	0,24	11,3
6	3,82020	29,98	33,00	6,11500	47,99	65,50	1,93250	15,16	1,21	0,87560	6,87	0,29	12,7
24	3,84550	36,33	45,25	4,11430	38,87	53,06	1,94260	18,35	1,46	0,68155	6,44	0,23	10,6
30	3,38185	34,51	55,97	2,98285	30,44	41,54	2,80095	28,58	2,28	0,63500	6,48	0,21	9,8
48	4,05005	50,86	96,65	0,00000	0,00	0,00	3,06925	38,54	3,08	0,84355	10,59	0,28	8,0

e) [AGL] = 4,5%; [Lipase/aciltransferase] = 0,54 % (m/m)

Tempo (h)	EMAG			TAG			AGL			DAG			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa*	Área	% Área	%Massa	
0	0,00000	0,00	0,00	7,08059	61,51	94,93	2,70022	23,46	4,50	1,73061	15,03	0,57	11,5
3	5,47767	28,00	29,89	8,29462	42,40	65,44	3,99032	20,40	6,28	1,800297	9,20	0,60	19,6
6	6,3052	33,62	34,41	6,67195	35,57	54,90	4,175809	22,26	9,81	1,602709	8,55	0,53	18,8
9	6,32568	53,56	34,52	0	0,00	0,00	3,91271	33,13	9,96	1,571738	13,31	0,52	11,8
12	6,29584	54,13	34,36	0	0,00	0,00	4,25366	36,57	10,20	1,081245	9,30	0,36	11,6
24	5,58737	51,97	30,49	0	0,00	0,00	4,52678	42,11	10,88	0,636203	5,92	0,21	10,8
30	7,25858	49,85	39,61	0	0,00	0,00	6,48038	44,50	7,13	0,822961	5,65	0,27	14,6
48	6,70003	44,65	36,56	0	0,00	0,00	7,20015	47,98	9,66	1,10637	7,37	0,37	15,0

*Determinação da percentagem de AGL do meio reaccional por titulação.

ensaio	tempo (h)	m (g)	v (cm3)	Acidez (AGL)
Óleo 1,6%	3	1,84	5,1	7,8
	6	1,84	5,4	8,3
	9	1,84	5,5	8,4
	24	1,84	6,1	9,3
	30	1,84	6,3	9,7
	48	1,84	5,3	8,1

f) [AGL] = 1,6%; [Lipase/aciltransferase] = 0,54 % (m/m)

	EMAG			TAG			AGL			DAGtotal			
Tempo (h)	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa*	Área	% Área	%Massa	Soma das áreas
0	0,00000	0,00	0,00	5,65911	65,98	97,91	1,44642	16,86	1,60	1,47162	17,16	0,49	8,6
3	1,87875	12,51	10,25	8,66521	57,69	85,62	2,91584	19,41	7,8	1,559221	10,38	0,52	15,0
6	4,04056	25,58	22,05	6,72607	42,58	63,19	3,15479	19,97	8,3	1,874397	11,87	0,62	15,8
9	5,41484	46,32	29,55	0	0,00	0,00	4,89061	41,83	8,4	1,384788	11,85	0,46	11,7
12	6,72374	57,24	36,69	0	0,00	0,00	4,58905	39,07	8,6	0,43277	3,68	0,14	11,7
24	6,85648	55,56	37,41	0	0,00	0,00	4,63295	37,54	9,3	0,851471	6,90	0,28	12,3
30	6,19168	53,51	33,79	0	0,00	0,00	4,70666	40,68	9,7	0,672863	5,81	0,22	11,6
48	7,05689	52,76	38,51	0	0,00	0,00	5,56407	41,60	8,1	0,753512	5,63	0,25	13,4

Determinação da acidez do meio reaccional segundo a norma

ensaio	tempo (h)	m (g)	v (cm3)	Acidez (AGL)
Óleo 4,5%	3	1,84	4,1	6,3
	6	1,84	6,4	9,8
	9	1,84	6,5	10,0
	24	1,84	7,1	10,9
	30	1,84	4,65	7,1
	48	1,84	6,3	9,7

Anexo IV

Comportamento suporte accurel sem enzima imobilizada

[AGL] = 4,5%; [Lipase/aciltransferase] = 0 % (m/m)

Tempo (h)	FAME		TAG		AGL		DAGtotal		Soma das áreas
	Área	% Área	Área	% Área	Área	% Área	Área	% Área	
0	0,0	0,00	19,2486	60,03	8,80108	27,45	4,01575	12,52	32,1
3	0,0	0,00	8,7643	60,96	4,39435	30,57	1,2176	8,47	14,4
6	0,00	0,00	6,8749	57,57	3,63185	30,41	1,4352	12,02	11,9
9	0,00	0,00	0,0000	0,00	0,00000	0,00	0	0,00	0,0
24	0,00	0,00	5,0594	75,69	0,00000	0,00	1,62475	24,31	6,7
30	0,00	0,00	3,9419	100,00	0,00000	0,00	0	0,00	3,9
48	0,00	0,00	1,3979	100,00	0,00000	0,00	0	0,00	1,4

Anexo V

Produção de biodiesel catalisada por enzima imobilizada em Eupergit C

a) [AGL] = 4,5%; [Lipase/aciltransferase] = 0,33 % (m/m)

Tempo (h)	EMAG			TAG			AGL			DAG			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	
0	0,00000	0,00	0,00	7,52932	59,70	94,85	3,13201	24,83	4,50	1,95020	15,46	0,65	12,6
3	1,05611	13,35	20,56	3,77139	47,66	75,72	1,37925	17,43	3,16	1,70697	21,57	0,56	7,9
6	1,65230	16,80	26,20	4,33188	44,03	69,96	1,69362	17,22	3,12	2,15974	21,95	0,71	9,8
9	2,33786	18,66	25,28	5,54924	44,30	70,38	2,51840	20,10	3,64	2,12192	16,94	0,70	12,5
24	2,73181	32,21	47,66	2,50680	29,56	46,97	2,37904	28,05	5,08	0,86240	10,17	0,29	8,5
30	2,90935	32,90	45,15	2,77000	31,32	49,77	2,34569	26,53	4,81	0,81782	9,25	0,27	8,8
48	3,60692	33,68	47,67	3,14586	29,37	46,67	3,19601	29,84	5,41	0,76078	7,10	0,25	10,7

b) [AGL] = 1,6%; [Lipase/aciltransferase] = 0,33 % (m/m)

Tempo (h)	EMAG			TAG			AGL			DAG			Soma das áreas
	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	Área	% Área	%Massa	
0	0,00000	0,00	0,00	8,43568	70,08	97,89	2,05085	17,04	1,60	1,54999	12,88	0,51	12,0
3	1,28328	22,06	26,41	2,99486	51,48	71,91	0,91084	15,66	1,47	0,62810	10,80	0,21	5,8
6	2,26303	23,12	32,74	4,56056	46,59	65,07	1,92600	19,67	1,85	1,03988	10,62	0,34	9,8
9	2,50806	28,17	41,70	3,57332	40,13	56,05	1,81355	20,37	1,91	1,00950	11,34	0,33	8,9
24	2,41483	31,10	48,23	2,74114	35,30	49,30	1,82878	23,55	2,21	0,78113	10,06	0,26	7,8
30	2,84167	34,67	48,19	2,90271	35,41	49,46	1,88979	23,05	2,16	0,56332	6,87	0,19	8,2
48	1,72599	36,68	45,35	1,75895	37,38	52,22	1,22039	25,94	2,44	0,00000	0,00	0,00	4,7